

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

**Biopatología de la IgA Polimérica : evidencia de su  
participación en la patogenia de las nefropatías de la IgA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Jaime Sancho López**

Madrid, 2015



TP  
1983  
136

X - 52 - 013005 - 9

Jaime Sancho López

**BIOPATOLOGIA DE LA IgA POLIMERICA. EVIDENCIA DE SU PARTICIPACION  
EN LA PATOGENIA DE LAS NEFROPATIAS DE LA IgA**

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1983



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

136/83

© Jaime Sancho López

Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1983

Xerox 9200 XB 480

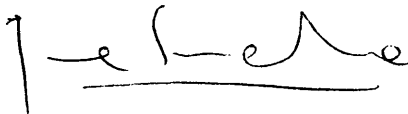
Depósito Legal: M-18052-1983

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA.

"BIOPATOLOGIA DE LA IgA POLIMÉRICA.  
EVIDENCIA DE SU PARTICIPACIÓN EN LA PATOGENIA  
DE LAS NEFROPATÍAS DE IgA."

Memoria que, para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas, presenta:

JAIME SANCHO LOPEZ



Director:  
Dr. D. JESUS EGIDO DE LOS RIOS  
Adjunto del Servicio de Nefrología  
Fundación Jiménez Díaz



Ponente:  
Dr. D. ANGEL MARTIN MUNICIO  
Catedrático de Bioquímica  
Facultad de Ciencias Biológicas.

Madrid, Febrero 1982.



**A Mercedes**  
**A mis Padres.**



## **FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ**

CLINICA DE NUESTRA SEÑORA DE LA CONCEPCION  
Avda Reyes Católicos, 2 - Ciudad Universitaria  
MADRID-3

## **T E L E F O N O S**

244 16 00 - 244 17 00  
244 49 00 - 244 01 00

**D. JESUS EGIDO DE LOS RIOS, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Honorario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid**

**CERTIFICA:** Que D. Jaime Sancho López, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha llevado a cabo los trabajos aquí expuestos en el Laboratorio de Inmunopatología Renal del Servicio de Nefrología de la Fundación Jiménez Díaz, bajo su dirección.



**Madrid, quince de febrero de mil novecientos ochenta y dos.**





## AGRADECIMIENTOS.

Esta Tesis es el fruto del trabajo de los últimos tres años pero también supone una feliz continuación del camino emprendido, hace ya más de cuatro años, cuando entré en el Servicio de Nefrología de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid recién acabada la licenciatura.

Al presentar la tesina para optar al Grado de Licenciado expresaba mi esperanza de continuar en este mundo tan difícil y no siempre grato de la Investigación. Al cabo de dos años no puedo sino reafirmarme en las ideas allí esbozadas y agradecer, a todas aquellas personas que han hecho posible este trabajo, su ayuda y colaboración.

A mi director Dr. Jesús Egido de los Ríos. Su sorprendente y siempre renovada creatividad, su arrastre y poder de convencimiento, su espíritu crítico y su sentido de la anticipación han constituido para mí un continuo estímulo. Durante estos años no sólo he encontrado confianza, apoyo y estímulo, sino también amistad, sin la cual todo trabajo se convierte en algo vano, desolador y difícilmente soportable.

Al Dr. Angel Martín Municio, Catedrático de Bioquímica de la Facultad de C. Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, ponente de esta Tesis, por su supervisión, crítica y buenos consejos que han ayudado a mejorar y enriquecer el proyecto de trabajo y su posterior realización.

Al Dr. Luis Hernando Avendaño, Jefe del Servicio de Nefrología, base y apoyo constante de la esperanzadora realidad de un equipo interdisciplinario.

A Francisco Rivera Hernández que sin su amistad y ayuda desinteresada sería imposible la realidad de esta Tesis. Su capacidad de trabajo y su entusiasmo han sido un acicate continuo en el trabajo diario. Su revisión clínica de los pacientes que aquí se citan ha facilitado enormemente la interpretación de unos resultados que de otra forma carecerían de sentido.

A la Dra. Margarita López Trascasa, pionera de esta línea de trabajo; su labor durante estos años ha sido un ejemplo constante de tenacidad y buen hacer.

A Rosana Blasco Porras, continuadora ilusionada de una tarea que cada año se enriquece con nuevas aportaciones y matices.

Al Dr. Fernando Ortiz Masllorens, Jefe del Servicio de Immunología de la Fundación, por sus críticas y estimulantes observaciones. Al Dr. Alfonso Merchante Iglesias, subdirector de Investigación y Docencia y al Dr. José Perianes Carro, director de la Clínica de la Concepción por su ayuda material y moral.

Al Dr. Francisco Mampaso del Servicio de Inmunología del Centro Ramón y Cajal de Madrid y al Dr. Antonio Barat del Servicio de Anatomía Patológica de la Fundación Jiménez Díaz por el estudio de las biopsias renales. A los Dres. Félix Lorente y Gumersindo Fontán, del Servicio de Inmunología Infantil de la Ciudad Sanitaria La Paz de Madrid, por los estudios de quimiotaxis. Al Dr. J. M. Muelas del Servicio de Microbiología de la Fundación Jiménez Díaz por el cultivo de las células Raji.

A Rosario de Nicolás, por su inestimable y excelente ayuda técnica.

A Guillermo del Olmo Mingo y su Departamento por sus excelentes fotografías.

A Isabel Sancho López por su ayuda en la escritura a máquina.

A mi mujer Mercedes Zubiaur Marcos, que con su enorme empuje hace llevadera la más ingrata de las tareas. Sin su ayuda no hubiera podido progresar en la redacción del presente manuscrito.

Al resto de compañeros y compañeras que de alguna forma han contribuido a este trabajo.

Esta Tesis se ha realizado gracias a la ayuda de las becas de la Fundación Conchita Rábago y de la Fundación Jiménez Díaz. Igualmente parte del material utilizado ha sido costeado con varias ayudas del Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto Nacional de la Salud.

## Abreviaturas:

Ac.	Anticuerpo.
Ag.	Antígeno.
A-IgA	IgA multimérica agregada.
A-IgAm	IgA monomérica agregada.
A-IgAp	IgA polimérica agregada.
A-IgG	IgG agregada.
B	Linfocito derivado de la Bolsa de Fabricio.
BBS	Tampón borato salino.
BSA	Albúmina sérica bovina.
C	Región constante de una inmunoglobulina.
CA	Cirrosis alcohólica.
CHi	Dominio de la cadena pesada de una inmunoglobulina.
CH50	50% de lisis total inducida por el complemento.
cpm	Cuentas por minuto.
DEAE	Dietil aminoetil.
DNP	Dinitrofenil.
EDTA	Sal sódica del ácido etilendiamino tetraacético.
Fab	Fracción de una inmunoglobulina obtenida por digestión con papaína, que contiene uno de los sitios de unión al antígeno.
Fc	Id. que contiene el sitio de unión al complemento, responsable de muchas propiedades biológicas.
H	Cadena pesada de una inmunoglobulina.
HSA	Albúmina sérica humana.
ICs	Inmunocomplejos.
IDD	Inmunodifusión doble.
IDR	Inmunodifusión radial.
IEF	Inmunoelectroforesis.
IF	Inmunofluorescencia.
Ig	Inmunoglobulina.
Inh-anti IgA	Inhibición de una anti IgA de baja afinidad.
Inh-anti IgA + PEG 3,5%	Id. precipitando con polietilenglicol al 3,5%.
L	Cadena ligera de la inmunoglobulina.
M	Macrófago.
OVA	Albúmina de huevo.
PBS	Tampón fosfato salino.
PEG	Polietilenglicol 6000.
Pm	Peso molecular.
PMNs	Polimorfonucleares neutrófilos.
Raji IgA	ICs detectados por las células Raji.
Raji IgG	Id. de IgG.
RIA	Radioinmunoanálisis.
SHN	Suero humano normal.
SC	Componente secretorio.
T	Linfocitos derivados del timo.
TBS	Tampón Tris salino.
TCA	Ácido tricloroacético.

TCM	Medio de cultivo de tejidos.
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano.
Tris-Tyrode	Solución Tyrode tamponada con Tris.
V	Región variable de una inmunoglobulina.

## INDICE

Agradecimientos.	iv
Abreviaturas más utilizadas	vi
<b>1. INTRODUCCION.</b>	<b>1</b>
1.1. Características generales de las inmunoglobulinas.	1
1.2. Propiedades físico-químicas de la IgA.	2
1.2.1. <i>Propiedades generales.</i>	2
1.2.2. <i>Pesos moleculares de la IgA humana.</i>	3
1.2.3. <i>Subclases y alotipos de la IgA humana.</i>	3
1.3. Propiedades biológicas de la IgA.	4
1.3.1. <i>Activación del complemento.</i>	5
1.3.2. <i>Propiedades biológicas de la IgA polimérica.</i>	5
1.4. Mecanismos de transporte de la IgA.	6
1.4.1. <i>Transporte de la IgA a las secreciones intestinales.</i>	6
1.4.2. <i>Transporte de la IgA a la bilis.</i>	6
1.5. Biología de los inmunocomplejos (ICs).	7
1.5.1. <i>Factores que influyen en la formación de los ICs.</i>	7
a. <i>Los antígenos.</i>	7
b. <i>Los anticuerpos.</i>	8
c. <i>Efecto de la valencia sobre el tamaño de los ICs.</i>	8
d. <i>Efecto de la concentración.</i>	8
e. <i>Efecto de la afinidad del anticuerpo.</i>	9
1.5.2. <i>Propiedades biológicas de los ICs.</i>	9
a. <i>Interacción con receptores celulares.</i>	9
b. <i>Activación del sistema del complemento.</i>	9
c. <i>Depósito tisular.</i>	10
1. <i>Influencia del tamaño de los ICs.</i>	10
2. <i>Papel del complemento.</i>	10
3. <i>Influencia de otros órganos del sistema mononuclear fagocítico.</i>	11
4. <i>Influencia del antígeno.</i>	12
5. <i>Influencia de los anticuerpos.</i>	12
1.5.3. <i>Papel de los ICs en la patogenia de las glomerulonefritis.</i>	12
a. <i>Mecanismos de depósito de los ICs en el glomérulo.</i>	13
b. <i>Mecanismos de depósito en el mesangio.</i>	13
c. <i>Modelos experimentales de lesiones mesangiales.</i>	15
d. <i>Modelos experimentales de nefropatía de IgA.</i>	15
e. <i>Enfermedades humanas asociadas con alteraciones significativas del mesangio.</i>	16
f. <i>Necesidad de estudiar los mecanismos de depósito de los ICs de IgA.</i>	16
1.6. Nefropatía mesangial de IgA.	17
1.6.1. <i>Papel de la IgA en la patogenia de la nefropatía de IgA.</i>	17
1.6.2. <i>Presencia de inmunocomplejos.</i>	18
1.6.3. <i>Factores de riesgo.</i>	18
<b>2. OBJETIVOS.</b>	<b>20</b>

<b>3. METODOS</b>	<b>22</b>
3.1. Técnicas generales.	22
3.1.1. Inmunodifusión doble dimensional.	22
3.1.2. Inmunodifusión radial.	22
3.1.3. Inmunoelectroforesis.	22
3.1.4. Marcaje de proteínas.	22
a. Método de la cloramina T.	22
b. Método de la lactoperoxidasa.	23
3.1.5. Reducción y alquilación.	23
3.2. Aislamiento de proteínas.	23
3.2.1. Aislamiento de IgA humana monomérica y polimérica.	23
3.2.2. Aislamiento de IgM humana.	24
3.2.3. Aislamiento de IgG de conejo y de IgG humana.	24
3.2.4. Aislamiento del componente secretorio (SC).	24
a. Formación de un inmuoadsorbente de IgM-Sepharosa.	24
b. Aislamiento del SC libre.	24
3.3. Metodología utilizada para el estudio de los pesos moleculares de la IgA sérica o depositada en el mesangio glomerular.	25
3.3.1. Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.	25
3.3.2. Radioinmunoanálisis de IgA (RIA).	25
3.3.3. Técnicas auxiliares del RIA.	25
a. Obtención de suero de cordero anti-IgG de conejo.	25
b. Valoración del 2º anticuerpo.	26
c. Valoración del 1º anticuerpo.	26
d. Afinidad del 1º anticuerpo.	26
e. Construcción de la curva standard.	26
3.3.4. Afinidad por el SC del suero y eluidos renales.	26
3.3.5. Detección por inmunofluorescencia de la IgA polimérica depositada en el mesangio glomerular.	27
3.3.6. Elución de las inmunoglobulinas depositadas en el riñón.	27
3.4. Métodos para la detección de inmunocomplejos (ICs).	28
3.4.1. Método de las células Raji.	28
3.4.2. Método de la inhibición de la unión de una IgM de conejo anti-IgA humana (Inh-anti IgA).	29
a. Marcaje.	29
b. IgA-Sepharosa 4B.	29
c. Técnica de la Inh-anti IgA.	29
3.4.3. Determinación de ICs de IgA polimérica.	29
a. Inmuoadsorbente anti IgM-Sepharosa.	30
b. Adsorción de la IgM.	30
c. Marcaje.	30
d. Sueros analizados.	30
e. Detección de los ICs de IgA polimérica.	30
f. Determinación de la concentración de SC empleada.	30
3.4.4. Determinación de anticuerpos específicos en ICs circulantes. Aplicación para ICs formados después de una dieta hiperproteica.	31
a. Sueros humanos.	31
b. Antígenos.	31
c. Marcaje.	31

d. Aislamiento de los ICs de sueros humanos.	31
e. Detección de los anticuerpos.	31
3.4.5. Expresión de los resultados de las técnicas de ICs.	31
3.5. Métodos utilizados en el estudio funcional de los polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) y de la influencia de la IgA sérica en pacientes con la enfermedad de Berger.	32
3.5.1. Aislamiento de PMNs.	32
3.5.2. Función fagocitaria.	32
3.5.3. Estudio de la motilidad.	32
a. Migración dirigida.	32
b. Migración al azar.	33
c. Estudio de posibles inhibidores de la migración dirigida.	33
3.6. Manejo de la IgA por el sistema mononuclear fagocítico.	33
3.6.1. Preparación de agregados de un tamaño definido.	33
3.6.2. Aclaramiento sanguíneo y localización tisular específica de los agregados de IgA ó IgG.	33
3.6.3. Marcaje de los hematíes con <sup>51</sup> Cr.	34
3.6.4. Catabolismo de los agregados por cortes de hígado y riñón.	35
3.6.5. Unión y catabolismo de los agregados por macrófagos peritoneales "in vitro".	35
3.6.6. Estudios de inhibición cruzada.	35
3.6.7. Aislamiento de hepatocitos.	35
3.6.8. Unión de los agregados de IgA a hepatocitos aislados.	36
<b>4. RESULTADOS.</b>	<b>37</b>
4.1. Estudio de los pesos moleculares de la IgA sérica y depositada en el mesangio glomerular.	37
4.1.1. Estudio de la IgA sérica en pacientes con cirrosis alcohólica.	37
4.1.2. Estudio de la IgA en riñones.	37
a. Estudio de la IgA eluida de riñones de autopsia.	37
b. Estudio de la IgA depositada por inmunofluorescencia.	38
4.1.3. Comparación de los pesos moleculares de la IgA sérica y eluida.	38
4.1.4. Estudio de la IgA sérica en pacientes con el síndrome de Schönlein-Henoch.	38
4.1.5. Estudios por inmunofluorescencia en el síndrome de Schönlein-Henoch y en la enfermedad de Berger.	39
4.1.6. Comparación de los pesos moleculares de la IgA sérica y de la IgA depositada en las tres enfermedades.	39
4.2. Estudio de ICs en la enfermedad de Berger y en la nefropatía de IgA secundaria a una cirrosis alcohólica.	39
4.2.1. ICs de IgA detectados por ultracentrifugación a pH 7,4 y pH 2,8.	39
4.2.2. ICs de IgA ó IgG detectados por las células de Raji y por la Inh-anti IgA.	40
4.2.3. Efecto de la difenilhidantoína (DFH) sobre los ICs.	40
4.2.4. Comparación de los ICs de IgA detectados por las cuatro técnicas.	41
4.2.5. ICs de IgA polimérica.	42
a. Controles.	42
b. Unión a diferentes concentraciones de suero.	42
c. Detección de ICs de IgA polimérica (IgAp) en la enfermedad de Berger.	43
4.2.6. Efecto de una dieta hiperproteica sobre los ICs circulantes.	43
a. Individuos normales.	43
b. Pacientes con la nefropatía de IgA.	43
c. Presencia de anticuerpos específicos contra antígenos alimentarios.	44
4.3. Papel de la IgA polimérica sérica en la modulación de algunas funciones leucocitarias en la enfermedad de Berger.	44



4.3.1. Efecto del plasma de los pacientes con la enfermedad de Berger sobre la migración de PMNs.	44
4.3.2. Efecto de la IgA polimérica y monomérica del plasma de pacientes con la enfermedad de Berger sobre la quimiotaxis de PMNs normales.	45
4.3.3. Función fagocitaria y quimiotáctica de los PMNs de los pacientes con la enfermedad de Berger.	46
4.4. Manejo de la IgA por el sistema mononuclear fagocítico.	46
4.4.1. Aislamiento de IgG.	46
4.4.2. Aislamiento de IgA monomérica.	46
4.4.3. Aislamiento de IgA polimérica.	46
4.4.4. Aclaramiento sanguíneo de los agregados de IgA (A-IgA) e IgG (A-IgG).	47
4.4.5. Captación tisular de A-IgA y A-IgG.	47
4.4.6. Catabolismo de la A-IgA y A-IgG depositada en el hígado y riñón.	47
4.4.7. Unión y catabolismo de la A-IgA y A-IgG por macrófagos peritoneales.	47
4.4.8. Aclaramiento sanguíneo de agregados de IgA polimérica y monomérica vs las mismas proteínas sin agregar.	48
4.4.9. Captación específica por los órganos.	48
4.4.10. Estudios de inhibición cruzada in vivo.	49
4.4.11. Unión de las diferentes proteínas a los hepatocitos.	49
5. DISCUSION.	41
6. CONCLUSIONES.	48
7. BIBLIOGRAFIA.	61

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Características generales de las inmunoglobulinas.

La propiedad fundamental del sistema inmunitario es su capacidad de responder ante la presencia de una sustancia extraña (antígeno) con la producción de anticuerpos que la reconocen y la eliminan selectivamente. Los antígenos son generalmente de pesos moleculares elevados, pero sólo ciertas regiones del antígeno, los determinantes antigénicos, son reconocidos por los anticuerpos. De hecho, independientemente de la estructura que tenga, un determinante antigénico tiene un tamaño de 5 a 34 Å. Por otro lado, un animal puede fabricar muchos anticuerpos diferentes para un mismo antígeno y el número casi ilimitado de antígenos, potencialmente reconocibles, por el sistema inmunitario de un animal, supone la síntesis de innumerables anticuerpos diferentes. Estudiando la estructura bioquímica de las inmunoglobulinas se pone en evidencia la posibilidad del sistema inmunitario para producir tantos anticuerpos diferentes.

El estudio de la secuencia de los aminoácidos que constituyen las cadenas pesadas (H) y las cadenas ligeras (L) han revelado una estructura muy característica: las cadenas L ( $k$  ó  $\lambda$ ) tienen alrededor de 220 aminoácidos en los que se distinguen dos regiones de un tamaño similar: el extremo carboxiterminal es siempre idéntico en las moléculas de las inmunoglobulinas pertenecientes a la misma clase, subclase y alotipo, mientras que la secuencia del extremo aminoterminal varía mucho más de una molécula a otra. Estas dos regiones se denominan las regiones constantes y variables respectivamente. Las cadenas H tienen una longitud aproximadamente el doble que la de las cadenas L (fig. 1) y el análisis de la estructura primaria de las cadenas H de una misma clase muestra una organización idéntica a la de las cadenas ligeras: una región variable aminoterminal de 110–120 aminoácidos y una región constante de unos 330 aminoácidos en la región carboxiterminal.

La comparación de las regiones variables de las cadenas ligeras y de las cadenas pesadas muestra que la variabilidad no está distribuida uniformemente a lo largo de la cadena. Ciertas zonas son más variables –hipervariables– que otras, constituyendo la combinación de las zonas hipervariables de una cadena ligera y de una cadena pesada el sitio de reconocimiento del antígeno por el anticuerpo.

Las regiones variables (V) de las cadenas L y H y la región constante (C) de la cadena L tienen un solo puente disulfuro intracatenario y las regiones C de las cadenas pesadas tienen varios. Dada la gran homología de secuencia entre estos segmentos de las cadenas polipeptídicas se denominan "regiones de homología" o "dominios" (fig. 1) (184). Los estudios de difracción de rayos X han mostrado que las distintas subunidades de homología de las inmunoglobulinas comparten un modelo común de plegamiento polipeptídico. Cada dominio de homología de las regiones constantes está constituido por dos hojas de estructura  $\beta$ , una con cuatro cadenas polipeptídicas antiparalelas y la otra con tres. Los dominios de las regiones variables presentan el mismo modelo aunque tienen un segmento adicional de cadena en forma de asa (fig. 2).

Las dos hojas contienen alrededor del 50% de los residuos presentes en cada región de homología. Los restos polares y apolares se van alternando, especialmente en las zonas que no están implicadas en las interacciones con otros dominios. Las dos hojas se encuentran en una disposición casi paralela e incluyen en su interior un núcleo formado por las cadenas laterales de los restos hidrofóbicos además del puente disulfuro intracatenario que une las dos hojas (fig. 2) (1 y 133).

Este modelo es muy conservativo, observándose que la mayoría de los cambios estructurales ocurren en los segmentos de la cadena que no participan en la estructura. Los segmentos hipervariables no forman parte de ella y aunque están muy alejados, en lo que se refiere a la estructura primaria, espacialmente se presentan muy próximos y determinan la conformación del centro combinante con el antígeno. Los sitios de unión están totalmente expuestos a la acción de los disolventes y su conformación está determinada por la secuencia de aas de las cadenas L y H, siendo única para cada inmunoglobulina. Los segmentos de la cadena que conexas los dominios globulares muestran diversos grados de flexibilidad, propiedad que puede ser importante en el mecanismo de unión al antígeno y en la consi-

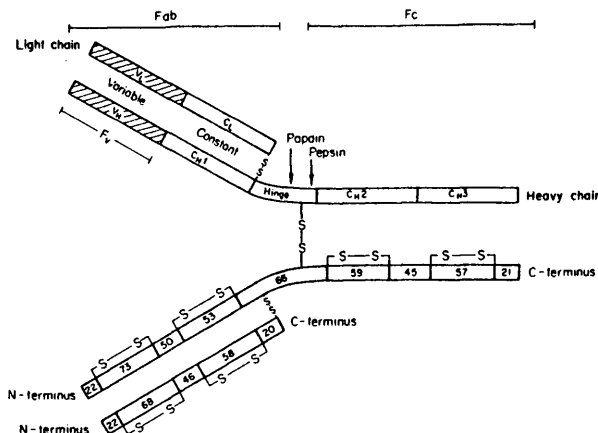


Fig. 1.— Representación esquemática de la estructura de la IgG. En la parte superior de la figura se dan los nombres de varias partes de la molécula. En la parte inferior se muestran los puentes disulfuro intracatenarios que delimitan las diferentes regiones de homología (Tomado de 133).

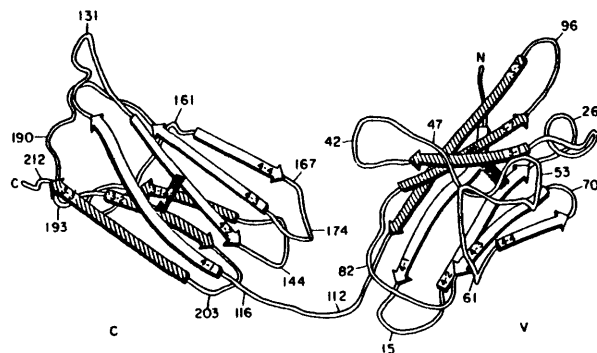


Fig. 2.— Plegamiento de los dominios de la región C y V de un dímero de cadena ligera cristalizado. Las flechas blancas (4.1 a 4.4) corresponden a una de las hojas formada por cuatro cadenas polipeptídicas antiparalelas y las flechas estrías (3.1 a 3.3) representan la otra hoja formada por tres cadenas. El sentido de las flechas va desde el extremo N-terminal al C-terminal. La barra de color negro representa el puente disulfuro intracatenario (De 133).

guiente activación de las funciones secundarias o efectoras, al implicar a dominios alejados del sitio de unión al antígeno.

El estudio de la estructura primaria y terciaria de las inmunoglobulinas apoya la idea de que los dominios de homología se formaron durante la evolución por un mecanismo de duplicación génica y diversificación. Este mecanismo dotaría a las inmunoglobulinas de las bases estructurales para ejercer diferentes funciones. Es decir, cada dominio habría evolucionado para ejercer una determinada función, sin que los mecanismos evolutivos hubieran alterado el modelo general (1). Así, la unión del C1q a la IgG está mediado exclusivamente por el dominio Cγ2 y la unión a los macrófagos y monocitos se realiza a través del dominio Cγ3. Sin embargo para que la IgG se una a los neutrófilos se requiere la fracción Fc intacta y por tanto los dominios Cγ2 y Cγ3. Aunque todavía no se sabe si es que el sitio activo está formado por estructuras de ambos dominios o bien si el sitio está localizado en un dominio y su actividad está modulada por los dominios vecinos. En cualquier caso, para ejercer la mayoría de las funciones efectoras se necesita más de un dominio. Por tanto, podría ser tan probable la hipótesis de la evolución de los dominios para ejercer determinadas funciones, como la evolución de los sitios de reconocimiento de las inmunoglobulinas (receptores para el Fc, etc.) para poder reconocerlas con efectividad (42).

Algunas de las propiedades físico-químicas, metabólicas y biológicas de las cinco clases de inmunoglobulinas humanas están resumidas en las tablas I y IV. Ahora describiremos brevemente las propiedades estructurales y funcionales propias de la clase IgA.

## 1.2. Propiedades Físicoquímicas de la IgA.

### 1.2.1. Propiedades generales.

En el hombre la IgA representa aproximadamente el 20% de las inmunoglobulinas séricas. La mayor parte es monomérica, con una estructura similar al resto de las inmunoglobulinas, es decir, una unidad básica de 160.000 daltones de peso molecular y un coeficiente de sedimentación 7 S, compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas (llamadas α) y dos ligeras (κ ó λ). Carece casi totalmente de estructura helicoidal y por microscopía electrónica se ha visto que tiene la misma forma de Y aplanada y las mismas medidas que la IgG (ver fig. 1). Carece de flexibilidad segmental, es decir, de la posibilidad de que las porciones Fab roten independientemente del resto de la molécula, con posibles implicaciones en su baja capacidad aglutinante y precipitante. Tiene una carga negativa relativamente más alta que la IgG, siendo la inmunoglobulina que tiene una movilidad electroforética más rápida. El contenido en aminoácidos es similar al de la IgG exceptuando la baja cantidad de lisina y el elevado número de cisteínas. El coeficiente de extinción para la IgA es  $E_{280}^{1\%} = 13,4$  prácticamente el mismo que el de la IgG. (79).

Tiene tres dominios en la región constante de la cadena pesada como la IgG y probablemente la IgD, mientras que la IgM y la IgE tienen cuatro (fig. 3). La posición de los puentes disulfuro entre las cadenas pesadas y ligeras también varía. Las cadenas μ, α, δ, ε y γ (exceptuando la γ1) tienen este puente entre la V<sub>H</sub> y C<sub>H</sub>1, mientras que en la IgG1 y en algunas moléculas de IgA2 (alotipo A2m (2)) lo tienen entre CH1 y CH2 (fig. 3). (133).

El contenido en carbohidratos de la IgA (7-8%) es mucho mayor que el de la IgG (2-3%) pero mucho más bajo que el de la IgM, IgD, o IgE (12-13%). Al igual que la IgD y algunas cadenas ligeras tipo λ, la IgA difiere del resto de las inmunoglobulinas en que tiene grupos de N-acetil galactosamina uniendo los hidratos de carbono a la cadena polipeptídica. Comparándola con la IgG, la IgA humana es mucho más soluble en agua, se comporta como una pseudoglobulina y resiste mucho mejor la precipitación con Zn<sup>++</sup>, Cd<sup>++</sup> o con precipitantes fenólicos. Precipita con sulfato amónico 1,2-1,8 M a pH 7,0 al igual que la IgG. También precipita de una forma reversible con Rivanol 0,0065 M pH 8,0 o etanol al 25% (a 5° C) e irreversiblemente o con desnaturalización, con ácido perclórico 0,6 M o tricloro acético 0,15 M (a una concentración proteica del 1%). En cualquier caso,

Tabla I.1. PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS HUMANAS.

Inmunoglobulina	Cadena pesada	Coficiente de sedimentación	Peso mol.	Peso mol. cadena pesada	Nº dominios cadena pesada	Hidratos de carbono (%)
IgG1	$\gamma 1$	7S	146000	51000	4	2-3
IgG2	$\gamma 2$	7S	146000	51000	4	2-3
IgG3	$\gamma 3$	7S	170000	60000	4	2-3
IgG4	$\gamma 4$	7S	146000	51000	4	2-3
IgM	$\mu$	19S	970000	65000	5	12
IgA1	$\alpha 1$	7S	160000	56000	4	7-11
IgA2	$\alpha 2$	7S	160000	52000	4	7-11
IgAs	$\alpha 1$ ó $\alpha 2$	11S	385000	52-56000	4	7-11
IgD	$\delta$	7S	184000	69700	5	9-14
IgE	$\epsilon$	8S	188000	72500	5	12

Tabla 1.2. CARACTERISTICAS METABOLICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS HUMANAS.

Inmunoglobulina	Vida media ( días )	Distribución ( % intravascular )	Tasa metabólica fraccional ( % del pool intravascular catabolizado diariamente )	Tasa de síntesis ( mg/kg/día )
IgG1	21		7	
IgG2	20		7	
IgG3	7	45	17	33
IgG4	21		7	
IgM	10	80	8,8	3,3
IgA1	6			
IgA2	6	42	25	24
IgAs	-	-	-	-
IgD	3	75	37	0,4
IgE	2	50	71	0,02

22

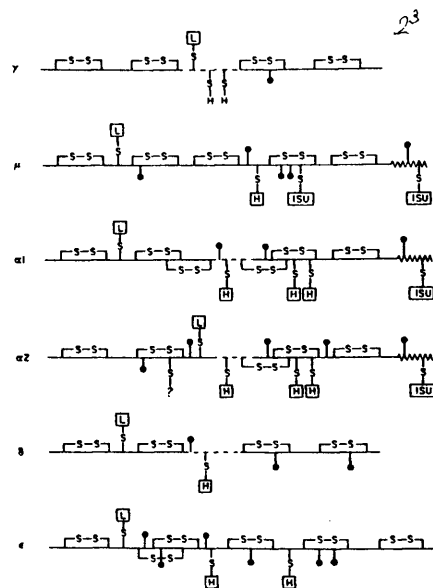
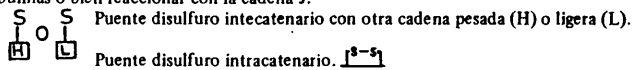


Fig. 3.— Disposición de los puentes disulfuro inter e intracatenarios y de los carbohidratos en las cadenas pesadas humanas. La IgG está representada por la IgG1. Las otras subclases de IgG difieren en el número y en la posición de los puentes disulfuro intercatenarios. Hay un octapéptido adicional en el extremo C-terminal de las cadenas  $\alpha$  y  $\mu$  que contiene un grupo SH que puede formar un puente disulfuro inter-subunidad (ISU) en las formas poliméricas de estas inmunoglobulinas o bien reaccionar con la cadena J.



† Hidrato de Carbono. (Tomado de 133).

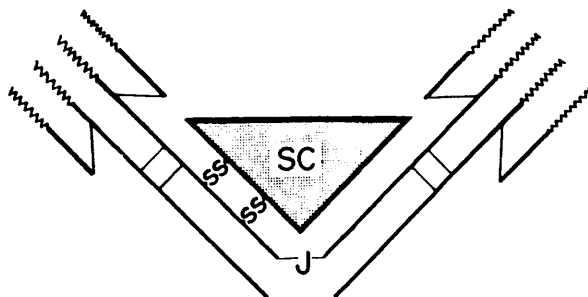


Fig. 4.— Modelo de la estructura de la IgAs humana. El componente secretorio (SC) está unido solamente a una de las dos subunidades Fc. No está todavía muy claro si la cadena J está unida mediante puentes disulfuro a una o a ambas subunidades Fc. La posición real de los puentes disulfuro que unen la IgA y el SC no se conocen todavía, pero cada puente disulfuro podría unir también una cadena diferente dentro de la misma subunidad Fc. La IgA dimerica sérica tiene la misma estructura que la IgAs exceptuando que no tiene SC. (Tomado de 60).

todo procedimiento de precipitación, aunque sea suave, tiende a favorecer la formación de agregados de IgA. (79).

#### 1.2.2. *Peso molecular de la IgA humana.*

Respecto al tamaño, la IgA sérica humana no es homogénea, siendo en su mayor parte monomérica (7S) y teniendo un 10-20% de polímeros con coeficientes de sedimentación más altos. Por el contrario, en la mayoría de los animales la IgA sérica está en forma de dímeros y en menor proporción de polímeros de mayor peso molecular (79). La IgA dimérica del suero humano, tiene un peso molecular de 350.000 D y está constituida por dos monómeros de IgA unidos entre sí por una cadena polipeptídica llamada cadena J. Esta tiene 16.000 D de peso molecular y se une covalentemente a las dos cadenas  $\alpha$ , mediante dos cisteínas presentes en un octapéptido adicional en el extremo carboxiterminal (fig. 3). Las formas poliméricas de IgA difieren de los monómeros, no sólo en el peso molecular, sino también en la movilidad electroforética (los polímeros migran más hacia el ánodo) y en otras propiedades físico-químicas (2). La forma predominante de IgA en las secreciones salivares, lacrimales, bronquiales, nasales e intestinales se denomina IgA secretoria. Tiene un coeficiente de sedimentación de 11 S y un peso molecular de 400.000 D. Está estructurada como la IgA dimérica del suero, pero con la adición de una nueva cadena polipeptídica llamada componente secretorio. Esta glicoproteína tiene 71.000 D de peso molecular y está unida por dos puentes disulfuro a una sola subunidad de IgA monomérica en la cadena pesada (fig. 4). (60).

#### 1.2.3. *Subclases y alotipos de la IgA humana.*

Se conocen dos subclases de IgA en base a las diferencias antigénicas, y por tanto estructurales, observadas en las cadenas  $\alpha$ . Se denominan IgA1 e IgA2, teniendo esta última dos alotipos: A2m (1) y A2m (2). La subclase IgA2 representa el 7% de la IgA sérica normal, mientras que en las secreciones externas se encuentra en concentraciones relativas más altas (aproximadamente el 50-60%) (79).

La movilidad electroforética de la IgA2 suele ser más rápida que la de la IgA1 y difieren en el contenido de oligosacáridos. Así, la IgA2 carece de galactosamina, mientras que las dos subclases tienen restos de glucosamina (200). El alotipo A2m (1) carece de enlaces covalentes entre las cadenas pesadas y ligeras (fig. 5) y además, las cadenas ligeras están unidas covalentemente una a otra. Para mantener su integridad estructural, las interacciones no covalentes son mucho más fuertes en A2m (1) que en A2m (2) o IgA1. Estas características estructurales diferentes, junto a la presencia de glucosamina en Asn-211, el cambio de Pro por Ser en 212 y de Pro por Arg en 221 en A2m (2) (But) respecto a A2m (1) (Lan) dan como resultado un cambio conformacional en torno a Cys-220 que determina probablemente el carácter alotípico (200) (Fig. 6).

La región bisagra (tomada arbitrariamente desde Val-222 hasta Arg-245, (fig. 6), es idéntica en los dos alotipos A2m. Ambos tienen una delección de trece aminoácidos, incluyendo cinco oligosacáridos de galactosamina (fig. 6), mientras que la cadena  $\alpha$ 1 (Bur), tiene una duplicación interna de ocho residuos. La delección de las cadenas  $\alpha$ 2, implica que tengan una secuencia de cinco prolina seguidas, que les dota de una gran rigidez (fig. 6).

Excluyendo la región bisagra y el contenido en carbohidratos, la región constante del alotipo A2m (1) (Lan) de la cadena  $\alpha$ 2 difiere de la  $\alpha$ 1 (Bur) en sólo catorce posiciones, todas ellas compartidas con el alotipo A2m (2) (But) de  $\alpha$ 2. Sin embargo el alotipo A2m (2) difiere en 6 posiciones adicionales, donde el alotipo A2m (1) y la cadena  $\alpha$ 1 son idénticos (posiciones 212, 221, 411, 428, 458 y 467) (fig. 6). Se cree que la cadena  $\alpha$  de A2m (1) se habría originado por un cruzamiento interdominios entre los genes que codifican  $\alpha$ 1 y A2m (2), resultando en una cadena recombinante o híbrida, que comenzaría como  $\alpha$ 2 y terminaría como  $\alpha$ 1 (200).





### 1.3. Propiedades biológicas de la IgA.

Las inmunoglobulinas son moléculas polifuncionales porque no sólo se unen a sus correspondientes antígenos (función primaria) sino que también tienen una serie de funciones secundarias o efectoras. Estas propiedades pueden manifestarse independientemente de la unión al antígeno, como por ejemplo, la unión de un anticuerpo libre a un receptor de una membrana celular, o pueden expresarse solamente después que la fracción Fab del anticuerpo se haya unido al antígeno, como la fijación del complemento.

Dado que la IgA es la inmunoglobulina predominante en la mayoría de las secreciones externas y sin embargo, solamente representa un sexto de todas las inmunoglobulinas séricas en el hombre y todavía menos en la mayoría de los animales, parece lógico pensar, que su papel fundamental debe ser el de proteger las mucosas y no el ejercer las funciones efectoras clásicas de las otras inmunoglobulinas (IgG o IgM) a nivel sistémico. Así, el título de anticuerpos de IgA en las secreciones mucosas se correlaciona mejor con la inmunidad contra muchas infecciones virales, que el título alcanzado en el suero (197). A pesar de todo no se conoce todavía con exactitud el mecanismo por el cual la IgA ejerce su actividad antimicrobiana.

La IgA secretoria tiene poca capacidad para opsonizar bacterias (218 y 222), pero muestra actividad de anticuerpo contra muchos microorganismos (198). Es importante señalar que la simple combinación de la IgA con los microorganismos o las toxinas bacterianas puede impedir la unión y la subsiguiente penetración a través de las células epiteliales del intestino (216). La eliminación de los inmunocomplejos que se forman como resultado de esta interacción, no tiene porqué estar mediada por mecanismos efectores secundarios, pudiendo realizarse por una simple exclusión propiciada por el movimiento peristáltico normal del intestino (161). La naturaleza dimerica de la IgA secretoria facilitaría la unión a los antígenos y la formación de inmunocomplejos relativamente grandes, que son más fácilmente atrapables por las secreciones mucosas. La interferencia con la movilidad bacteriana, observada en bacterias flageladas, también facilitaría la excreción.

El papel de la IgA en la regulación de la entrada de antígenos procedentes de la alimentación a través del epitelio intestinal, parece clave (212). La IgA puede controlar la respuesta inmunológica a determinados antígenos alimentarios, induciendo tolerancia contra una serie de sustancias potencialmente alérgicas (4 y 182).

#### 1.3.1. Activación del complemento.

Las IgA secretoria o sérica humanas no fijan el complemento por la vía clásica o alterna, aunque sí lo hacen por esta última cuando se agregan por el calor (16 y 168) o químicamente (66). Aunque esto haría pensar que todos los anticuerpos de IgA, agregados por sus antígenos específicos, también activarían la vía alterna (97), algunos autores no han conseguido activar el complemento por ninguna de las dos vías (32). Otros, han descrito la existencia en la saliva, de un anticuerpo anti-C3 de la clase IgA, que activa la vía clásica del complemento (215). El elevado coeficiente de sedimentación (>19S) y sus propiedades de factor reumatoide, impiden que estos resultados sean fácilmente aplicables a otros anticuerpos de IgA.

El estudio de la estructura y de las funciones biológicas de la IgA humana, siempre se ha visto dificultado por la incapacidad manifiesta de las enzimas proteolíticas más comunes, de producir el fragmento Fcα intacto, que, por analogía con otras clases de inmunoglobulinas, debe ser la región de la molécula del anticuerpo que modula alguna de sus funciones efectoras, incluyendo la fijación del complemento. Sin embargo, recientemente, se han descrito varios métodos para obtener los fragmentos Fcα (23 y 162). Estos fragmentos son capaces de activar la vía clásica del complemento (23 y 88) mientras que la IgA nativa no la activa en ningún caso, incluso si contiene gran cantidad de polímeros (23). Es posible por tanto, que la incapacidad de la IgA completa para interactuar con el CI no se deba a que carezca del sitio de unión, sino a que está enmascarado. También se ha sugerido, que

las características especiales de la región bisagra de la IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>, puede contribuir su incapacidad para unirse al complemento. En la IgA<sub>2</sub> la delección de 13 aas en esta región provoca una gran rigidez de la molécula (fig. 6), que impide la transmisión de la señal alostérica necesaria para un buen contacto entre los dominios Cα1 y Cα2. En la IgA<sub>1</sub>, la región bisagra tiene cinco oligosacáridos de GalN que también podrían impedir la interacción longitudinal de los dominios Cα1 y Cα2 (fig. 6).

La activación de la vía alterna del complemento, por inmunocomplejos insolubles de IgA, produce la solubilización parcial de los mismos. Se trata de un IgA de mielona de ratón con actividad de anticuerpo, pero con unas características estructurales más parecidas a la IgA<sub>2</sub> humana (carece de puentes S-S intercatenarios L-H) y posiblemente polimérica (139). Los inmunocomplejos de IgA humana con esas características o la IgA polimérica "per se" también podrían activar el complemento por la vía alternativa, una vez depositados en los tejidos. Sin embargo, los resultados obtenidos "in vitro" con sistemas muy simplificados, no pueden ser enteramente aplicados a las condiciones que existen "in vivo". En el caso del tracto gastrointestinal, la presencia de productos alimenticios, secreciones mucosas y enzimas indudablemente influyen en la respuesta inmunológica. Por otro lado, las funciones biológicas de la IgA sérica (polimérica o monomérica), no pueden ser extrapoladas sin más a la IgA secretoria y viceversa (161). Así, el componente secretorio dota a la molécula de IgA de propiedades totalmente diferentes, como puede ser una mayor resistencia al tratamiento enzimático (203).

### 1.3.2. Propiedades biológicas de la IgA polimérica.

La IgA polimérica del suero parece tener una serie de propiedades biológicas bien definidas, que la diferencian claramente de la IgA monomérica.

Puede eliminarse de la circulación por un mecanismo específico dependiente de los hepatocitos (ver sec. 1.4). La capacidad de precipitación y aglutinación de antígenos es significativamente mayor que la de la IgA monomérica (144). Influye en la respuesta inmunológica del huésped, ya que su inyección i.v. acelera la eliminación del antígeno y aumenta la subsiguiente producción de anticuerpos hacia el hapteno y el portador (186).

La IgA polimérica y probablemente los ICs de IgA, pueden modificar o modular la respuesta inflamatoria inhibiendo el efecto bacteriolítico, mediado por el complemento, de los anticuerpos IgG e IgM (44, 68, 76) o la fagocitosis mediada por la IgG pero no por el complemento (219). También tiene un efecto antiinflamatorio directo, dada su capacidad, al igual que la IgA secretoria, de inhibir la quimiotaxis y la función bactericida de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) (207, 208, 209). No provoca una supresión generalizada de las funciones celulares, dado que no inhibe la quimioluminiscencia y, sin embargo, aumenta la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (207). La IgA de mieloma insolubilizada o unida a una superficie no fagocitable estimula la liberación de enzimas lisosómicos de PMNs, sin necesidad de que haya endocitosis ni muerte celular, mientras que los agregados solubles parece ser que no la estimulan o lo hacen en menor grado (78), siendo estas acciones independientes de la especificidad antigénica de la IgA.

De estos estudios y de los llevados a cabo posteriormente (117), se deduce que existe un receptor específico para la IgA en PMNs humanos dependiente del Fc de la molécula. La existencia de receptores para IgA en diversas subpoblaciones de linfocitos (linfocitos T, B, no T, no B) (124, 125 y 189) y en otras poblaciones celulares como monocitos/macrófagos (53), parece indicar que, al contrario de lo que se pensaba anteriormente, la respuesta inmunológica específica de IgA está dotada de una gran eficacia. Así mismo, el descubrimiento de unas propiedades biológicas específicas de la IgA polimérica, junto al reconocimiento de su papel en patogenia de enfermedades experimentales y humanas (punto 1.6) confirman la idea de que la IgA juega un papel en un contexto mucho más amplio, al que previamente se le suponía restringido.

#### 1.4. Mecanismos de transporte de la IgA.

##### 1.4.1. Transporte de la IgA a las secreciones intestinales.

La IgA secretoria que se encuentra en las secreciones externas, es un producto de dos tipos de células: las células plasmáticas, que producen la IgA polimérica asociada con la cadena J y las células epiteliales, que producen el componente secretorio (136). Hace ya algún tiempo se creía que la IgA de las secreciones, derivaba directamente de la IgA sérica, pero los estudios inmuno-histoquímicos realizados posteriormente parecían indicar que la mayor parte de la IgA de las secreciones era producida localmente (21). Hoy en día se piensa que la IgA secretoria que aparece en las secreciones salivares, glándulas mamarias y en el tracto gastrointestinal, no es sintetizada totalmente por las células plasmáticas subepiteliales. La IgA polimérica producida en otros tejidos tales como la médula ósea, bazo y algunos ganglios linfáticos, puede transportarse por la sangre y secretarse mediante la unión a células epiteliales productoras de SC, distantes espacialmente del lugar de producción de IgA (136).

Se han propuesto varios modelos para explicar el transporte selectivo de IgA (21), pero el más aceptado considera que el SC y la cadena J son como "la cerradura y la llave", de la translocación selectiva de la IgA dimerica y de la IgM pentamérica, a través de las células epiteliales. La incorporación de la cadena J a los dos isotipos induce un cambio conformacional en los mismos, que permite la combinación, mediante interacciones no covalentes, con el SC en la membrana plasmática de las células epiteliales. Una vez formados, los complejos IgA-SC y IgM-SC son transportados por endocitosis en vesículas citoplásmicas a la luz glandular, en un proceso en el que participan los microtubulos (fig. 7).

Hay al menos dos características de este proceso muy poco comunes. Primero, la IgA secretoria es una proteína compuesta por cadenas polipeptídicas fabricadas en dos tipos diferentes de células (cél. plasmáticas y epiteliales). Segundo, el SC es un receptor de membrana que no sólo media la unión y el transporte de otra proteína, sino que también permanece unido a la IgA después de dejar la célula epitelial (161).

Es importante resaltar que no ha sido definitivamente excluido que la célula epitelial pueda expresar receptores específicos para la fracción Fc de la IgA e IgM (21). Aún en este caso, posiblemente la IgA dimerica se transportaría más rápidamente que la IgA monomérica, debido a que tendría el doble de sitios de unión. Por otro lado en ciertas especies hay un transporte efectivo de IgG (dimerica) a través del intestino (24) y mediante estudios en ratas "in vivo" se ha visto que las células epiteliales intestinales tienen receptores para la IgG específicos para la región Fc de la molécula (70). Aun así, en las secreciones externas hay mayor cantidad de IgA monomérica que IgG, posiblemente transportada por difusión intercelular (21). La IgA monomérica sérica o bien la IgA monomérica producida por los inmunocitos locales (22) podría unirse a las células epiteliales intestinales a través del Fc con mayor eficacia que la IgG.

##### 1.4.2. Transporte de la IgA a la bilis.

Otra fuente significativa de IgA intestinal, al menos en algunos animales (73), es la IgA dimerica transportada activamente por el hígado a la bilis contra un gradiente de concentración (94 y 153). El proceso de transporte ha sido visualizado por autorradiografía (15) y parece ser análogo al de los enterocitos: los hepatocitos expresan SC en su membrana y transportan la IgA dimerica unida al SC por endocitosis (57, 142, 152 y 166). No hay que olvidar que embriológicamente, los hepatocitos derivan del intestino y pueden considerarse como una célula epitelial especializada.

Es un mecanismo de transporte muy efectivo, ya que el endotelio de los sinusoides de la vena porta es discontinuo, y con muchas fenestras. Así si inyectamos i.v. IgA polimérica, tendrá un contacto casi instantáneo con la membrana del hepatocito que da a los sinusoides, transportándose a la

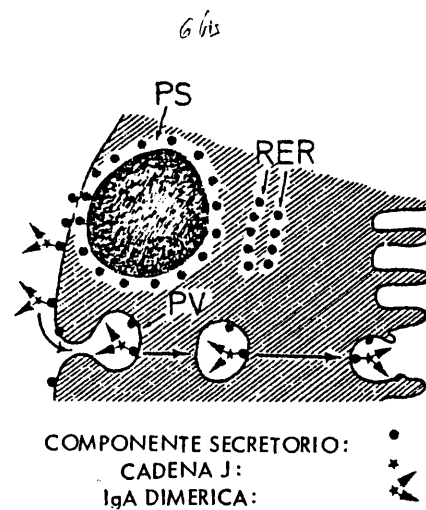


Fig. 7.— Modelo de transporte basado en la consideración del componente secretorio (SC) como "la cerradura" y de la cadena J como "la llave" en la recepción y translocación de la IgA dimerica, desde la formación de los complejos SC-IgA en la membrana basolateral plasmática (izquierda) de las células epiteliales secretoras hasta la expulsión de las vesículas pinocíticas (derecha) conteniendo la IgA secretoria completa y algo de SC libre. RER = Retículo endoplásmico rugoso, PS = espacio perinuclear, PV = vesícula pinocítica. (De 21).

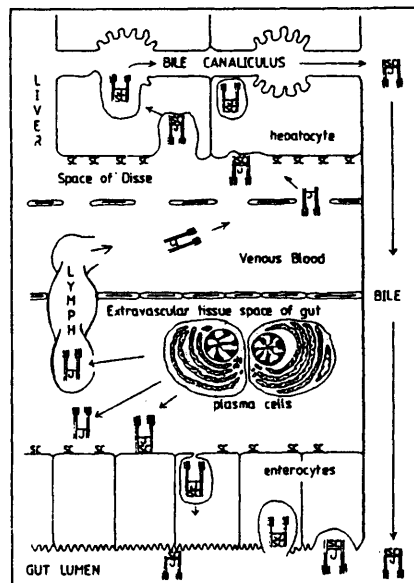


Fig. 8.— Diagrama de los mecanismos por los que la IgA es transportada al intestino. Las células plasmáticas en las submucosas secretan IgA polimérica (con cadena J) en el espacio extravascular del intestino. Parte de esta IgA dimerica se une inmediatamente al componente secretorio (SC) en los enterocitos y es transportada a la luz del intestino. El resto de la IgA se recoge por los canales linfáticos y es llevada, vía el canal mesentérico y torácico, a la circulación sanguínea. Allí, la IgA circula hasta alcanzar la vena porta donde pasa rápidamente a través de las fenestras del endotelio de los sinusoides portales y se une al SC en la membrana del hepatocito. Mediante vesículas endocíticas los complejos SC-IgA atraviesan el citoplasma del hepatocito y son descargados en el sistema biliar que conduce al duodeno. (De 72).

bilis mucho antes de que haya podido difundir, a través de los capilares del intestino, y alcanzar los enterocitos (fig. 8). Puede considerarse por tanto que la IgA que alcanza el intestino mediante el transporte por el hígado, ha sido producida en su mayor parte localmente. Así mismo, una parte significativa de la IgA dimerica sérica deriva de la producida por las células plasmáticas intestinales, transportada por la linfa mesentérica y el canal torácico a la sangre (79 y 96).

Diversos autores han demostrado que no sólo es posible, mediante ese mecanismo, eliminar IgA polimérica libre, sino también IgA en forma de ICs (158, 170 y 181). Pero el transporte de IgA polimérica a través del hígado, no sólo tiene importancia porque aumenta la eficacia del sistema inmunitario contra antígenos procedentes del tracto intestinal, sino que puede tener un papel clave en la eliminación de ICs que de otra forma, permaneciendo en la circulación sanguínea, podrían tener efectos deletéreos como es el depósito en el mesangio glomerular (167).

### 1.5. Biología de los inmunocomplejos (ICs).

La formación de ICs es un componente de la respuesta inmunológica normal encaminada a eliminar y/o neutralizar los antígenos. También parecen ejercer una importante influencia sobre las respuestas humorales y celulares interaccionando con linfocitos T y B. Dependiendo de diversos factores tales como la relación molar del antígeno y del anticuerpo, de la concentración absoluta de los ICs y de la clase y afinidad del anticuerpo, aumentan o suprimen las funciones inmunológicas, por mecanismos todavía no conocidos con exactitud (193) (ver tabla II). En diversas enfermedades se han detectado ICs circulantes o depositados en varios tejidos por lo que han sido implicados en su patogénesis. El propósito de este resumen es el de definir las condiciones bajo las cuales se forman ICs, sus implicaciones biológicas y considerar su papel en la patogenia de las glomerulonefritis humanas.

#### 1.5.1. Factores que influyen en la formación de los ICs.

La interacción antígeno-anticuerpo es reversible y las fuerzas intermoleculares que contribuyen a su estabilización son de la misma clase que las implicadas en la estabilización de la configuración específica de las proteínas y macromoléculas: coulombicas (electrostáticas), de Van der Waals (fuerzas de dispersión de London), dipolares, puentes de hidrógeno y uniones hidrofóbicas (apolares). Desde este punto de vista, la unión de un anticuerpo y un antígeno puede ser considerada, como un reparto competitivo del antígeno entre el agua y los sitios de unión en el anticuerpo que son relativamente hidrofóbicos. Por ello, los antígenos poco solubles en agua (haptenos dinitrofenilados) tenderán a formar ICs muy estables, mientras que los antígenos muy solubles (azúcares) formarán ICs más disociables (193).

La formación, destino, actividades biológicas y potencial flogogénico de los ICs dependerá de la naturaleza de los anticuerpos (reactividad con los mediadores de la inflamación, valencia, afinidad) y de los antígenos (tamaño, valencia, composición química), así como de la relación molar y concentración absoluta de los dos componentes (tabla III).

##### 1.5.1.a. Los antígenos.

Los antígenos son sustancias que interaccionan específicamente con anticuerpos apropiados o linfocitos sensibilizados. El término inmunógeno se refiere a las sustancias que después de la administración a un huésped apropiado provocarán una respuesta inmunológica. Se hace esta distinción, porque no todas las sustancias que reaccionan con anticuerpos o con linfocitos sensibilizados, provocan una respuesta inmunológica. La porción concreta de una molécula antigénica, que reacciona con el sitio de unión del anticuerpo o con el receptor específico en un linfocito sensibilizado, se define como determinante antigénico y el número de determinantes antigénicos de una molécula, determina la valencia con que interacciona con un anticuerpo específico. Así, una molécula antigénica puede

TABLA II

EFFECTOS DE LOS ICs SOBRE LAS RESPUESTAS INMUNOLOGICAS.

Respuestas humorales

A. Supresión

- A través de la interacción con los antígenos y los receptores para el Fc en los linfocitos B (supresión antígeno específica ).
- A través de la interacción con los receptores para el Fc en los linfocitos B ( supresión no ( antígeno específica ) ).
- Liberación de factores supresores de los linfocitos B.
- Bloqueo de las células efectoras
- Activación de los linfocitos T.
- Bloqueo de los receptores antígenicos en los linfocitos T.
- Bloqueo de la interacción entre linfocitos T y B.
- Acción sobre los macrófagos.

B. Estimulación

- Incremento de la síntesis de DNA de los linfocitos B ( proliferación ).
- Localización rápida de los antígenos en los folículos linfoides.
- Incremento de la unión del antígeno a los receptores antígenicos celulares.
- Estimulación de los linfocitos T cooperadores.
- Aproximación de células colaboradoras a través de los receptores Fc y C3.

Respuestas celulares

- Inhibición o incremento de la toxicidad mediada por células y dependiente del anti-cuerpo.
- Bloqueo de las reacciones linfocitarias mediadas por células.
- Bloqueo de la hipersensibilidad retardada.
- Alteración del tráfico de linfocitos .

TABLA III.

Parametros que determinan el tamaño, destino y actividades biológicas de los inmunocomplejos

---

Antigenos

- Tamaño
- Valencia
- Propiedades fisico-químicas (carga, solubilidad)
- Impedimento estérico de los determinantes antigenicos

Anticuerpos

- Clase y subclase
- Afinidad
- Valencia
- Número de especificidades antigénicas reconocidas
- Propiedades biológicas del anticuerpo

Disponibilidad

- Concentración relativa de los componentes(relación antígeno/anticuerpo).
- Concentración absoluta
- Síntesis de los anticuerpos
- Lugar de entrada del antígeno y persistencia en el organismo
- Eliminación de los ICs por el sistema mononuclear fagocítico, o por depósito tisular (específico o no).
- Catabolismo (no inmune) del antígeno y del anticuerpo

Interacciones físicas

- Electrostáticas
  - Van der Waals
  - Bipolares
  - Puentes de hidrógeno
  - Uniones hidrofóbicas
-



tener la valencia de uno para un determinado anticuerpo, pero si tiene estructuras químicas repetitivas, su valencia será mayor para el mismo anticuerpo específico. Además, una molécula determinada puede tener determinantes antigénicos diferentes y, por tanto, será capaz de reaccionar con anticuerpos de diferentes especificidades. Es decir, el número de determinantes antigénicos de una molécula influirá profundamente en la clase de  $IC_s$  que pueda formar con anticuerpos específicos (128).

#### 1.5.1.b. Los anticuerpos.

Los anticuerpos, que son la otra parte esencial en los  $IC_s$ , pueden ser de la clase IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. La IgG, IgA monomérica, IgD e IgE tienen una valencia de dos, es decir, tienen dos sitios de unión para un determinado antígeno. La IgA dimérica tiene una valencia de cuatro y la IgM de cinco a diez, dependiendo del tipo de antígeno.

Cuando ocurre la unión antígeno-anticuerpo, se pueden formar  $IC_s$  muy diferentes; desde una molécula de antígeno y una de anticuerpo (Agl—Acl) hasta  $IC_s$  con muchas moléculas de cada uno de los reactivos. La estructura o malla tridimensional que se forme, reflejará el número de moléculas de antígeno y de anticuerpo en cada complejo. A su vez, la malla influirá en las propiedades biológicas del  $IC$ .

#### 1.5.1.c. Efecto de la valencia sobre el tamaño de los $IC_s$ .

El tamaño de los  $IC_s$  está influido por varios factores. Como ya se ha dicho antes la valencia de la mayoría de los anticuerpos es dos, pero estudios detallados con IgA polimérica o IgM no se han realizado. La valencia de los antígenos influye muy significativamente en la malla que se forma con unos anticuerpos determinados. Una molécula antigénica monovalente sólo puede formar complejos  $Ag_2 - Ac_1$  y no  $IC_s$  de mayor tamaño o inmunoprecipitados. Los antígenos bivalentes pueden formar, dependiendo de la distancia entre los determinantes antigénicos,  $IC_s$  con las fórmulas siguientes: Agl—Acl,  $Ag_2 - Ac_2$ ,  $Ag_3 - Ac_3$  (de forma circular), o complejos abiertos o cerrados todavía más grandes. Todos estos  $IC_s$  forman mallas pequeñas y son solubles. Solamente los antígenos multivalentes, pueden formar  $IC_s$  con mallas muy grandes y complejas y precipitar en determinadas condiciones (fig. 9) (133).

#### 1.5.1.d. Efecto de la concentración.

La concentración relativa del antígeno y del anticuerpo determina la relación de combinación antígeno-anticuerpo, que puede variar desde un exceso de antígeno, pasando por la equivalencia, hasta un exceso de anticuerpo.

Un exceso de antígeno da lugar a  $IC_s$  de pequeño tamaño porque los sitios de unión del anticuerpo están cubiertos y las oportunidades para formar una malla son limitadas (fig. 10 a, d y g). Esto es así, independientemente de la valencia del antígeno y puede producir la solubilización de inmunoprecipitados. Cuando la relación molar está cerca o en el punto de equivalencia, se forman los  $IC_s$  más grandes porque, por definición, el número de determinantes antigénicos es igual al número de sitios de unión del anticuerpo. Por tanto, se minimiza la competición por los sitios de unión, mientras que las oportunidades para un entrecruzamiento entre los  $IC_s$  es máxima (fig. 10. e. y h.). En el punto de equivalencia, los antígenos oligovalentes forman  $IC_s$  solubles muy grandes (fig. 10) y los antígenos multivalentes normalmente forman precipitados. En el sobrenadante la concentración de antígenos o anticuerpos libres es a menudo indetectable. (fig. 10).

El efecto de un exceso de anticuerpo en el tamaño de los  $IC_s$  depende de la valencia del antígeno (109). Los antígenos oligovalentes forman complejos más pequeños que los que se forman a equivalencia de una forma análoga a la que ocurre en exceso de antígeno (fig. 10. f.). Por el contrario, en exceso de anticuerpo, normalmente, los antígenos multivalentes precipitarán. Además, los precipitados que se forman con antígenos multivalentes en el punto de equivalencia son raramente solubili-

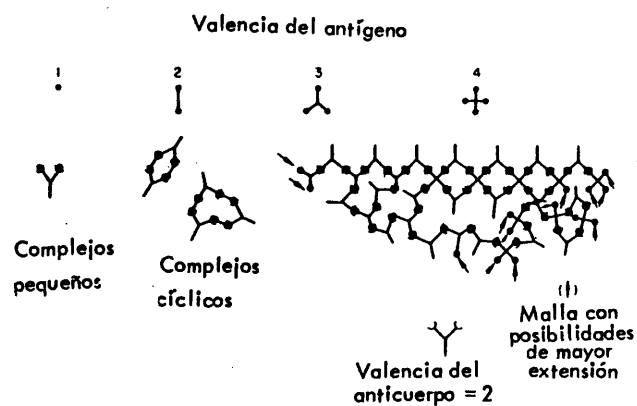


Fig. 9.— Efecto de la valencia del antígeno sobre el tamaño del complejo formado con un anticuerpo del tipo IgG. La capacidad de un sistema para hacer y extender la malla depende de que al menos uno de los reactivos sea divalente y que el otro sea como mínimo trivalente. El tamaño de los oligómeros cíclicos está también limitado por consideraciones termodinámicas (de 133).

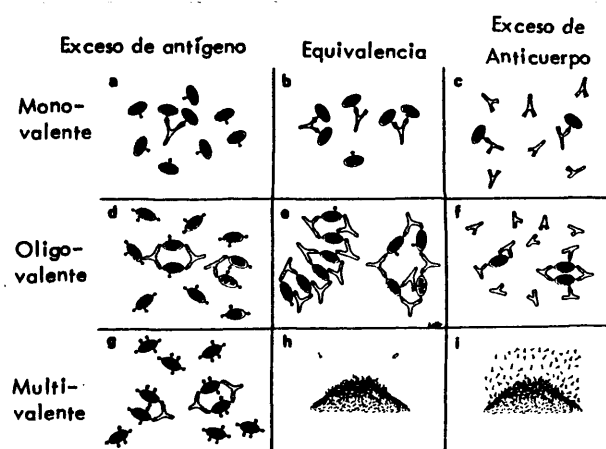


Fig. 10.— Efecto de la valencia del antígeno y de la relación antígeno/anticuerpo sobre el tamaño y la composición de los inmunocomplejos. (De 109).

zados y solamente cuando las concentraciones del anticuerpo son extraordinariamente altas.

La concentración absoluta del antígeno y del anticuerpo también influye en el tamaño y composición de los IC<sub>s</sub>. Parece ser una consecuencia de la ley de acción de masas (109). Los IC<sub>s</sub> solubles crecen en tamaño por interacciones entre ellos mismos, de una forma análoga a la polimerización. Incrementando las concentraciones de los reactivos, la reacción se desplaza hacia la derecha ( $\text{Ag} + \text{Ac} \rightleftharpoons \text{Ag-Ac}$ ) de forma que se une una proporción mayor de Ag y Ac para formar IC<sub>s</sub> de mayor tamaño.

#### 1.5.1.e. Efecto de la afinidad del anticuerpo.

La constante de asociación entre el antígeno y el anticuerpo también influye en el tamaño de los IC<sub>s</sub>. Cuando la  $K_a$  es baja para una relación molar determinada, tenderán a formarse IC<sub>s</sub> de pequeño tamaño (109). En general, las características inmunoquímicas de los IC<sub>s</sub> presentes en las enfermedades humanas no han sido examinadas con el suficiente detalle como para poder correlacionar sus características con el desarrollo y curación de la enfermedad. Sin embargo, en animales de experimentación se ha visto que inyectando IC<sub>s</sub> preformados "in vitro", el tamaño de los mismos determina de alguna forma el tejido donde se deposita, como detallaremos más adelante.

#### 1.5.2. Propiedades biológicas de los IC<sub>s</sub>.

Las propiedades biológicas más importantes en cuanto a su influencia en el desarrollo de diversas enfermedades son: interacción con receptores celulares, activación del complemento y depósito en los tejidos. Estas propiedades dependen de la clase y subclase del anticuerpo, del tamaño de los IC<sub>s</sub> y en menor grado de las propiedades de los antígenos. Otras propiedades biológicas de los IC<sub>s</sub>, como son la influencia que ejercen en la respuesta inmunológica del huésped y las alteraciones funcionales de los linfocitos, son menos conocidas a nivel molecular y las hemos comentado brevemente en el comienzo del punto 1.5. (109, 128 y 193).

##### 1.5.2.a. Interacción con receptores celulares.

Los receptores para la fracción Fc de las inmunoglobulinas median la mayor parte de las interacciones de los IC<sub>s</sub> con los neutrófilos, monocitos (incluyendo los macrófagos de tejidos y las células de Kupffer), plaquetas y ciertas subpoblaciones de linfocitos T y B. Estos receptores son específicos para la clase o subclase de la inmunoglobulina (Tabla IV), estando mejor estudiados los receptores para la IgG.

La interacción de las células fagocitarias (polimorfonucleares neutrófilos y monocitos/macrófagos) está influida por el tamaño de los IC<sub>s</sub>. Los monómeros de IgG se unen a los receptores celulares muy débilmente (citofilia) y no son interiorizados o fagocitados, mientras que los IC<sub>s</sub> de gran tamaño (con al menos dos moléculas de anticuerpo) se unen con mayor afinidad y terminan siendo fagocitados.

##### 1.5.2.b. Activación del sistema del complemento.

La IgG1, IgG2 e IgG3 humanas son capaces de activar el complemento por la vía clásica, mientras que la IgG4 es ineficaz. Para que la activación sea efectiva, los ICs deben estar formados al menos por dos, tres o cuatro moléculas de IgG según los autores (31 y 87). De las otras inmunoglobulinas solamente la IgM puede activar el complemento por la vía clásica. La activación de la vía alterna puede producirse, en determinadas condiciones, con las dos subclases de IgA (ver 1.3.1), siendo más eficaces los IC<sub>s</sub> insolubles que en solución y los IC<sub>s</sub> de IgA poliméricas o secretoria que los IC<sub>s</sub> de IgA monomérica.

La activación del complemento por los IC<sub>s</sub> puede producir efectos beneficiosos o perjudicia-

Tabla IV. RECEPTORES PARA EL Fc Y EL C EN LAS CELULAS SANGUNEAS HUMANAS.

Tipo de célula	Receptores para el Fc			Receptores para factores del complemento					
	IgG	IgA	IgM	IgE	C1q	C3a	C3b-C4b	C3bi	C3d C5a C5b
Eritrocitos	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Plaquetas	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Neutrófilos	+	-	+	-	-	+	+	+	+
Macrófagos	+	-	-	-	-	?	+	+	?
Eosinófilos	+	-	-	?	-	+	+	+	+
Basófilos/Mastocitos	+	-	-	+	-	+	?	-	+
Linfocitos B	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Linfocitos T	+	+	+	+	-	-	-	-	-

a) Datos recientes sugieren que los neutrófilos y macrófagos no tienen receptores para el C3d ( CR2 )

b) No demostrado todavía

c) Hay receptores para el C5b en algunas células linfoblásticas humanas ( cél Raji ). Se han encontrado receptores para el C5b idénticos a los receptores para el C3b.

d) Inicialmente se creía que había receptores para el C1q en los linfocitos T y B.

e) Se han descrito receptores para el C3 en linfocitos T, aunque solamente de forma ocasional.

f) Id. para el Fc de la IgA en monocitos/macrófagos.

les en el individuo dependiendo de diversos factores. Influye considerablemente en la captación de los  $IC_3$  circulantes por diversos tejidos como veremos en 1.5.2.c.2. La activación por  $IC_3$  insolubles ya depositados o formados "in situ" puede producir la acumulación de neutrófilos y/o monocitos/macrófagos. Estas células a su vez pueden fagocitar los  $IC_3$  o ser estimulados por ellos provocando la liberación de diversos mediadores de la inflamación, con el consiguiente daño tisular (26, 78, 150, 178). Por efecto de la activación del complemento se pueden resolubilizar  $IC_3$  insolubles facilitando su eliminación (139), así como facilitar la unión, fagocitosis y degradación de  $IC_3$  solubles o insolubles (107, 150 y 211).

#### 1.5.2.c. Depósito tisular.

La concentración de  $IC_3$  en la circulación en un momento determinado depende de la tasa de formación y de la tasa de eliminación de los  $IC_3$ . La tasa de formación es una función de la cantidad de antígenos y de anticuerpos específicos contra esos antígenos. En las enfermedades humanas, o en los modelos experimentales, esas variables no han sido cuantificadas. La tasa de eliminación de los  $IC_3$  de la circulación es una función de su captación por el sistema mononuclear fagocítico (SMF) y del depósito tisular.

##### 1.5.2.c.1. Influencia del tamaño de los $IC_3$ .

El destino de los  $IC_3$  circulantes se ha estudiado cuantitativamente mediante la inyección de  $IC_3$  preformados de un tamaño y composición conocidos, generalmente con  $IC_3$  de IgG.

Los  $IC_3$  de gran tamaño con al menos dos moléculas de anticuerpo (más grandes que  $Ag_2-Ac_2$ ), se eliminan rápidamente de la circulación cuando se inyectan a ratones, conejos o monos no inmunizados previamente (128). La desaparición de esos  $IC_3$  sigue una función exponencial y la vida media de los  $IC_3$  se correlaciona con la dosis inyectada. Al incrementar la dosis, la tasa de eliminación disminuye y la velocidad de aclaramiento de los complejos alcanza una meseta, indicando que el sistema es saturable (128). El órgano que capta mayor cantidad de  $IC_3$  es el hígado, a través de las células de Kupffer mediante los receptores para el Fc de la IgG.

Los  $IC_3$  de pequeño tamaño, definidos como aquellos que tienen una o dos moléculas de anticuerpo (ej.:  $Ag_2-Ac_2$ ,  $Ag_2-Ac_1$ , ó  $Ag_1-Ac_1$ ) se eliminan más lentamente de la circulación que los  $IC_3$  de gran tamaño, pero mucho más rápidamente que los anticuerpos libres. La eliminación de estos  $IC_3$  puede ser descrita mediante dos curvas exponenciales. La primera de ella puede atribuirse al equilibrio entre el espacio intra y extravascular que se produce inmediatamente después de la inyección de los  $IC_3$ . La segunda curva, puede atribuirse al catabolismo.

Aunque todavía no está totalmente esclarecido el sitio donde se produce el catabolismo ni las consecuencias fisiológicas de esos  $IC_3$ , se han descrito recientemente dos mecanismos diferentes para la eliminación de  $IC_3$  de IgG ó IgM de pequeño tamaño. El primero de ellos se realiza a través de las células de Kupffer, por otro receptor distinto del ya descrito para el Fc de la IgG. Cuando la IgM se une al antígeno, se produce un cambio conformacional que permite que los restos de manosa de la IgM que permanecían ocultos se expresen al exterior siendo fácilmente reconocidos por un receptor específico en las células de Kupffer (38). El segundo mecanismo es específico para los  $IC_3$  de IgG en exceso de anticuerpo. Estos  $IC_3$  de pequeño tamaño no son reconocidos por las células de Kupffer sino por los hepatocitos, mediante los receptores para los restos de galactosa de la inmunoglobulina (195). En este sentido, otros autores (82) ya habían descrito que los  $IC_3$  de IgG en exceso de anticuerpo se unían con mayor facilidad a los hepatocitos que en exceso de antígeno.

##### 1.5.2.c.2. Papel del complemento.

Aparentemente, el complemento no juega un papel preponderante en la captación hepática

de los  $IC_3$  circulantes. Eliminando el complemento con veneno de cobra o con agregados de IgG, no se altera el aclaramiento y la captación hepática de  $IC_3$  solubles de IgG (128). Sin embargo, se ha demostrado exhaustivamente que la eliminación de  $IC_3$  insolubles capaces de activar el complemento, ocurre a través del receptor para el C3b de las células de Kupffer mientras que la eliminación de los  $IC_3$  insolubles incapaces de activar el complemento, se realiza principalmente por los macrófagos del bazo (58). También se ha demostrado, mediante estudios *in vitro*, que el complemento no sólo facilita la unión de los  $IC_3$  solubles o insolubles a los macrófagos peritoneales, sino que también aumenta la fagocitosis y posterior degradación (107, 150 y 211).

¿Cómo conciliar estos aspectos tan contradictorios? Es posible, que los  $IC_3$  insolubles no sean manejados de la misma forma que los  $IC_3$  solubles y que los estudios *in vitro*, no sean fácilmente extrapolables a las situaciones, mucho más complejas, que ocurren *in vivo*. Sin embargo, es sabido que la eliminación del complemento por el veneno de cobra no es total (aproximadamente el 90%) (17) y la cantidad de complemento que queda, puede que sea suficiente para activarse e incorporar algunas moléculas de C3b a los  $IC_3$ . En este sentido, la adición de solamente un 1% de suero humano fresco, es suficiente para aumentar la unión de agregados de IgG a macrófagos (107). También se necesitan muy pocas unidades de C1 fijado sobre los hematíes, para promover su captación por el hígado (58).

Otros factores que todavía complican más la interpretación de los resultados de Mannik y col. (128), son que los monocitos y las células linfoides también tienen receptores para el C1q y el hecho de que el hígado sea uno de los sitios principales de síntesis del complemento (150). Así estos autores han indicado que el tipo de  $IC_3$  usado por ellos debe fijar el C1q, dado que son capaces de depleccionar el CH50 (17). De todas formas, para que el complemento provoque un aumento de la fagocitosis y la degradación de agregados de IgG por los macrófagos *in vitro*, éstos deben tener un tamaño adecuado, porque la fagocitosis de agregados con sólo diez moléculas de IgG es, incluso, inhibida ligeramente en presencia de suero fresco (107).

La fagocitosis de  $IC_3$  que han activado el complemento podría prevenir su depósito patológico en los tejidos. Si los  $IC_3$  no activan el complemento o bien los fagocitos son incapaces de captarlos y fagocitarlos, el depósito tisular puede ocurrir más fácilmente. Una vez que los complejos están depositados, la fijación del complemento sería peligrosa, ya que podría provocar una acumulación local de PMNs o monocitos/macrófagos y causar una inflamación (150). En este sentido, la poca capacidad de la IgA, incluso en forma de  $IC_3$ , para activar el complemento, podría aumentar una vez que se depositara y estuviera en forma insoluble. Cualquiera que sea la interpretación que se den a estos resultados, la conclusión de que el complemento no es importante para el aclaramiento de  $IC_3$  solubles, necesitaría nuevos estudios para confirmarla.

#### 1.5.2.c.3. Influencia de otros órganos del sistema mononuclear fagocítico (SMF).

Quando se inyectan pequeñas cantidades de  $IC_3$  solubles, la captación por el bazo es muy pequeña (alrededor del 1%) y solamente con dosis saturables es posible alcanzar hasta un 10% de la cantidad captada por el hígado (128). Sin embargo, los  $IC_3$  particulados, como son los glóbulos rojos sensibilizados con anticuerpos específicos de IgG no activadores del complejo, son captados por el bazo a través de los receptores para el Fc (58). Utilizando este sistema, se ha encontrado que hay una saturación de la captación esplénica en algunas enfermedades humanas como Lupus erit ematoso diseminado, el síndrome de Sjögren y la Dermatitis herpetiformis (58 y 116). Sin embargo, la saturación de la captación hepática de  $IC_3$  a través del Fc, no ha sido todavía examinada en las enfermedades humanas, aunque si se ha descrito en animales con enfermedades crónicas por inmunocomplejos. En ratones NZB/W que desarrollan una enfermedad parecida al lupus humano, no se pudo demostrar que hubiera un defecto en el aclaramiento y captación hepática de  $IC_3$  de IgG (56), aunque posiblemente había un defecto en la fagocitosis o en la unión a las células de Kupffer, ya que la inyección posterior de una dosis saturante de agregados de IgG desplazaba fácilmente la unión de los  $IC_3$ , volviéndolos a la circulación. Estos  $IC_3$  pueden, en teoría, contribuir a la perpetuación del

proceso autoinmune mediante la interacción con linfocitos o depositarse en otros órganos como el mesangio glomerular (126).

#### *1.5.2.c.4. Influencia del antígeno.*

No se puede explicar la gran variedad de localizaciones y subsiguientes reacciones adscritas a los IC<sub>3</sub> solamente por el tamaño, clase o subclase del anticuerpo, y capacidad de fijación del complemento. Hay, por ejemplo, IC<sub>3</sub> que se fijan en la membrana basal glomerular y otros no y parece cada vez más evidente que el destino de los IC<sub>3</sub> puede ser alterado por la naturaleza de los antígenos. Así, el DNA tiene gran afinidad por la membrana basal glomerular y puede predisponer la formación de IC<sub>3</sub> en ese lugar mediante la unión posterior del anticuerpo (93). Además, mientras que el DNA desaparece rápidamente de la circulación localizándose en los órganos del SMF (52), los antígenos proteicos, como la albúmina sérica bovina, se catabolizan mucho más lentamente. Sin embargo, si esta proteína se conjuga con restos dinitrofenilados, se elimina rápidamente de la sangre en función de la densidad epitópica (128) y utilizando como antígenos polisacáridos desializados, se ha observado una eliminación más rápida de los IC<sub>3</sub> que con los mismos antígenos en presencia de ácido siálico (54).

#### *1.5.2.c.5. Influencia de los anticuerpos.*

El destino de los IC<sub>3</sub> también puede ser alterado por la naturaleza de los anticuerpos. La IgA, IgG2 e IgG4 humanas parece ser que no interaccionan con el receptor para el Fc de las células fagocíticas mononucleadas (128). Por tanto, los IC<sub>3</sub> que contengan esos anticuerpos, puede que permanezcan en la circulación más tiempo que aquellos IC<sub>3</sub> que sí interaccionan eficazmente con el receptor para el Fc. Incluso, estos anticuerpos pueden retrasar la eliminación de un antígeno que en estado libre se eliminaría más rápidamente (149). No hay que olvidar, tampoco, como hemos visto en la sección 1.4.2., que en el hígado hay otros receptores específicos, además del que hay para el Fc de la IgG en las células de Kupffer. El receptor para la IgA polimérica ya descrito, puede ser utilizado para eliminar IC<sub>3</sub> de IgA polimérica. También hay receptores para el Fc de la IgG y probablemente de la IgA en los hepatocitos, susceptibles de captar y eliminar parte de los IC<sub>3</sub> (82 y 83). Como hemos visto en 1.5.2.c.1. se han descrito receptores específicos para los restos de manosa o N-acetil glucosamina en las células de Kupffer y para la galactosa en los hepatocitos, a los que pueden unirse los IC<sub>3</sub> de IgM o IgG respectivamente, en exceso de anticuerpo.

#### *1.5.3. Papel de los inmunocomplejos en la patogenia de las glomerulonefritis.*

En la enfermedad aguda del suero, después de la inyección de una proteína sérica heteróloga, aparece una glomerulonefritis proliferativa difusa y una arteritis generalizada que coincide con la desaparición del antígeno, la aparición de IC<sub>3</sub> circulantes, la disminución de la actividad del complemento y el depósito de los IC<sub>3</sub> en diversos tejidos. La inyección diaria, de forma que se logre un exceso de antígeno después de cada inyección, resulta en una glomerulonefritis crónica pero no en vasculitis (217).

Estas características de las enfermedades aguda y crónica del suero arriba mencionadas, han sido los modelos casi exclusivamente utilizados para reconocer las enfermedades humanas en las que se sospechaba que los IC<sub>3</sub> pudieran tener un papel patogénico. El depósito de inmunoglobulinas en los tejidos de una forma granular o irregular, acompañada frecuentemente de factores del complemento, la presencia de IC<sub>3</sub> circulantes, niveles bajos de complemento o niveles altos de productos derivados de la activación del complemento, hacían pensar en una enfermedad producida por IC<sub>3</sub>. Sin embargo, utilizando nuevas técnicas, se han detectado IC<sub>3</sub> circulantes en muchas enfermedades crónicas, como hepatitis, endocarditis infecciosas, artritis reumatoide, lupus eritematoso diseminado, procesos malignos e incluso en individuos normales. No siempre la presencia de IC<sub>3</sub> conduce a vasculitis y glomerulonefritis, siendo, según algunos autores, muy pequeño el porcentaje de pacientes que

tienen glomerulonefritis y además  $IC_3$  circulantes (169 y 193). Tampoco suele haber correlación entre las inmunoglobulinas pertenecientes a los  $IC_3$  circulantes y a los  $IC_3$  depositados (151), probablemente porque no sean siempre patológicos los  $IC_3$  circulantes detectables. También se han encontrado  $IC_3$  circulantes en enfermedades glomerulares sin depósitos de inmunoglobulinas en el riñón como en el síndrome nefrótico (193) y son más frecuentes los  $IC_3$  circulantes en enfermedades sistémicas con complicaciones renales que en las glomerulonefritis primarias (115 y 193).

#### *1.5.3.a. Mecanismos de depósito de los $IC_3$ en el glomérulo.*

Se han realizado numerosos estudios para conocer los mecanismos que producen el daño glomerular. En la enfermedad aguda del suero, los depósitos glomerulares contienen el mismo antígeno presente en los  $IC_3$  circulantes y el antígeno no se deposita antes que el anticuerpo. Para que se produzca el depósito tisular, se requieren  $IC_3$  circulantes de un tamaño de 19 S o mayores (217). En cambio en la enfermedad crónica del suero, el sitio donde se depositan los  $IC_3$  depende de la respuesta inmunológica del huésped. Los animales muy respondedores producen  $IC_3$  en exceso de anticuerpo que no se depositan; los respondedores moderados forman  $IC_3$  más pequeños y solubles, que se depositan en el mesangio o en la región subendotelial de la membrana basal glomerular; los poco respondedores permanecen en exceso de antígeno y forman  $IC_3$  pequeños y solubles de un tamaño comprendido entre 300.000 y 500.000 D (15 S), que se depositan en el lado subepitelial de la membrana basal. Si se logra mantener un estado crónico de exceso de antígeno, independientemente de la respuesta de anticuerpo que se produzca, los depósitos se localizan casi exclusivamente en el lado subepitelial (63).

La mayoría de los intentos de estudiar los mecanismos de depósito de los  $IC_3$  circulantes se han realizado inyectando  $IC_3$  preformados. Solamente en estos modelos pasivos se ha podido establecer una relación causal entre la presencia de  $IC_3$  en la circulación y su depósito en los tejidos (ver 1.4.2.3.). Sin embargo, el depósito que se logra en estos modelos es casi siempre mesangial o subendotelial y no subepitelial (128). Los depósitos subepiteliales característicos de la enfermedad crónica del suero parecían indicar que los  $IC_3$  de pequeño tamaño podían penetrar la pared vascular y ser atrapados o precipitados en el espacio subepitelial. Sin embargo nunca se ha podido tener una evidencia experimental de este fenómeno (36).

No obstante, se han descrito otros mecanismos que pueden explicar cómo se producen los depósitos subepiteliales. Así, antígenos no glomerulares pueden unirse a componentes normales del glomérulo por afinidad de carga o de estructura. Una vez que el antígeno se ha unido al glomérulo, el anticuerpo específico puede unirse a su vez al antígeno formándose  $IC_3$  localmente. Si el antígeno se localiza en el lado subepitelial de la membrana basal, los  $IC_3$  que se formen serán también subepiteliales (36, 93 y 205). Igualmente, determinados componentes de la membrana basal pueden unirse a anticuerpos con los que tienen reactividad cruzada sin necesidad de formarse  $IC_3$  circulantes. En el caso del mesangio glomerular, como luego veremos, determinadas alteraciones del mismo pueden incrementar el depósito de macromoléculas, que sirven a su vez como "antígenos plantados" susceptibles de unir anticuerpos específicos (128).

#### *1.5.3.b. Mecanismos de depósito en el mesangio.*

La persistencia de la IgA a nivel del mesangio en biopsias iterativas, o incluso en riñones de pacientes en hemodiálisis periódicas con glomerulonefritis mesangial de IgA plantea la necesidad de conocer cuáles son los mecanismos de depósito de IgA en el mesangio glomerular.

Las células mesangiales ocupan una posición intercapilar en el centro de varias asas capilares del glomérulo renal. Sin embargo, en esta posición el mesangio está unido al endotelio, que lo separa de la luz capilar y la membrana basal glomerular, por lo que se puede considerar que forma parte de la pared capilar glomerular (fig. 11). Por tanto, en un sentido más estricto, el mesangio tiene una localización intracapilar y no intercapilar (138).



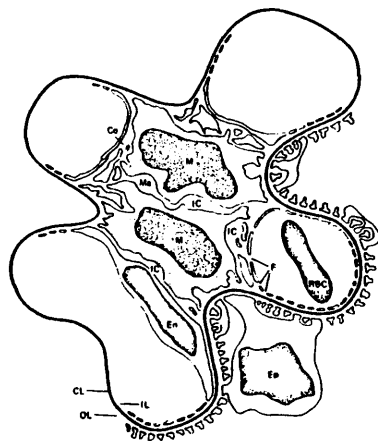


Fig. 11.— Diagrama de un mesangio de rata rodeado de capilares. La zona central de la membrana basal (CL) envuelve a los capilares como una sábana y también pasa por encima del mesangio. La frontera de éste con los capilares la constituyen las células endoteliales (En). Las células mesangiales (M) están parcialmente rodeadas por la matriz mesangial (M) en la que pueden encontrar a veces haces de colágeno (Co). Las fenestras del endotelio (F) permiten el paso de partículas y de plasma a los canales intercapilares e intercelulares (IC). Las células epiteliales (Ep) emiten unas evaginaciones primarias que se ramifican formando los podocitos (De 138).

Las células mesangiales tienen interdigitaciones citoplasmáticas que se extienden dentro del espacio subendotelial y se proyectan en ocasiones, entre las fenestras de las células endoteliales dentro de la luz capilar. Estos procesos citoplasmáticos contienen muchos organelos incluyendo microfilamentos de miosina, sugiriendo que las células mesangiales fueran células musculares lisas modificadas. Entre las células hay una substancia intercelular llamada matriz mesangial que, morfológicamente, es similar a la membrana basal glomerular aunque todavía no se conoce bien su estructura bioquímica y antigénica. El tallo de las ramas que forman el mesangio, se unen en un sincitio con las células del la-cis, que están contiguas a las células epitelioideas granulares de la arteriola aferente y la mácula densa del aparato yuxtaglomerular. Esta relación estructural tan íntima entre el mesangio y el aparato yuxtaglomerular es importante por dos razones: 1) El mesangio podría jugar un papel en la regulación del flujo sanguíneo glomerular aunque no hay todavía una evidencia concreta que apoye este concepto. 2) Esta región puede ser una ruta de salida de las macromoléculas que vienen del mesangio (138).

Mauer y col. (129 y 130) han estudiado la cinética de la captación y el manejo de las macromoléculas por las células mesangiales en diversas experiencias en animales. La inyección a ratas de elevadas dosis de macromoléculas, como la IgG agregada por el calor, provoca su localización en el mesangio, siendo máxima la captación a las 4 horas de la inyección. Después hay una pérdida de agregados por el mesangio, coincidiendo con la disminución en sangre, pero a una velocidad mucho menor. Al cabo de 72 horas prácticamente toda la proteína ha desaparecido.

Hay múltiples factores que modulan la captación de las macromoléculas por el mesangio, pero algunos de ellos han sido bastante estudiados, entre ellos: la concentración sérica de las macromoléculas, que a su vez está íntimamente relacionada con el sistema mononuclear fagocítico; las características de las macromoléculas (tamaño, tipo, digestibilidad, carga); las características de los capilares glomerulares y factores hemodinámicos. De todos ellos, la concentración en el suero de las macromoléculas es una de las variables más importantes, al menos en los modelos pasivos de enfermedades por ICs (77). Parece ser que la causa principal de que los niveles séricos de IgG agregada, ferritina o ICs sean tan importantes para la captación efectiva por el mesangio, se debe a la competencia que existe con el SMF. Así, si éste se muestra muy activo, la concentración en sangre de la macromolécula será relativamente baja y como consecuencia, también disminuirá la cantidad de material que se deposita en el mesangio y viceversa (138). Esta relación entre el SMF y el mesangio se pone en evidencia en ratas tratadas con hidrocortisona, que como se sabe, suprime la actividad fagocitaria del SMF. En estos animales, la captación mesangial de IgG agregada está notablemente aumentada, en parte debido a una disminución generalizada de la permeabilidad vascular (71), así como por cambios en la captación esplácnica (179).

En cuanto a las características de las macromoléculas, el tamaño es un factor muy importante. Así, las proteínas agregadas se depositan en mayor cantidad que sin agregar. También la digestibilidad relativa de una macromolécula puede jugar un papel importante en su aclaramiento por el mesangio. La persistencia prolongada de partículas, como el carbón coloidal o de polímeros de polivinil alcohol, se debe probablemente a una incapacidad de las células mesangiales y de los fagocitos para digerir esos residuos.

El tipo de inmunocomplejo influye en el lugar donde se deposita, como hemos visto anteriormente. Los complejos solubles de tamaño intermedio se localizan en el mesangio, mientras que los complejos de menor tamaño se depositan en los capilares periféricos. En otros estudios con ICs formados in vivo o administrados pasivamente, se ha visto que el mesangio capta mejor los ICs de gran afinidad y de una valencia alta (138).

La influencia de las características de los capilares glomerulares y de los factores hemodinámicos en el depósito de macromoléculas en el mesangio son muy poco conocidas y por ello no nos detendremos en ellas. Sin embargo, baste saber que en varios modelos de lesiones capilares glomerulares se ha visto que hay un incremento en la captación de agregados de proteínas, carbón coloidal y ferritina. Igualmente se ha observado un aumento de la captación macromolecular cuando hay una obstrucción bilateral de los ureteres, mientras que la obstrucción unilateral provoca una captación

menor, sin que se tenga una explicación plausible de la causa de todos estos fenómenos.

Una vez en el mesangio las macromoléculas pueden seguir varios caminos: ser degradadas por fagocitosis, moverse hacia el aparato yuxtaglomerular o volver de nuevo hacia la luz capilar (138). Se ha podido demostrar que el mesangio es capaz de captar y fagocitar activamente toda una serie de macromoléculas tales como: suspensiones inorgánicas de dióxido de torio, oro coloidal o carbón coloidal y polisacáridos como peroxidasa, catalasa o ferritina. Sin embargo, se ven muy pocas veces dentro de las células mesangiales proteínas agregadas o inmunocomplejos, probablemente porque la captación de partículas por el mesangio no sea de la misma forma que en el macrófago o polimorfonuclear (138). En este sentido se ha podido demostrar en unos interesantes estudios la infiltración glomerular de monocitos procedentes de la médula ósea después de la inyección pasiva de IC<sub>5</sub> preformados (188), siendo las únicas células que habían fagocitado IC<sub>5</sub>. Por tanto, parece claro que la participación activa del mesangio en la captación de macromoléculas dependerá de la naturaleza de aquella, teniendo en todo caso, menor capacidad fagocitaria que el SMF.

Algunas macromoléculas son transportadas desde la periferia del mesangio hasta la raíz del glomérulo y de aquí al aparato yuxtaglomerular, a través de los canales de la matriz mesangial. Sin embargo y a pesar de la proximidad con el túbulo distal (92) no hay ninguna evidencia de que haya una secreción activa de la orina.

Otro mecanismo que podrían utilizar las macromoléculas una vez depositadas en el mesangio sería la vuelta a la luz capilar. No hay ninguna evidencia morfológica que apoye esta hipótesis, pero para que fuera posible tendría que haber un equilibrio entre las macromoléculas presentes en la circulación sanguínea y las captadas por el mesangio, estando sometidas a influencias hemodinámicas que determinarían el depósito en ciertos lugares y no en otros. Cuando los niveles sanguíneos de las macromoléculas fueran bajos se establecería un nuevo equilibrio entre las partículas depositadas y las circulantes, disminuyendo la cantidad depositada. En este sentido la posibilidad de "disolver" los IC<sub>5</sub> depositados en el mesangio ha sido demostrado recientemente inyectando un exceso de antígeno (128). Por tanto, la interacción entre las sustancias depositadas y circulantes es un hecho que posibilita la remoción del material depositado y potencialmente patológico.

#### *1.5.3.c. Modelos experimentales de lesiones mesangiales.*

La primera demostración de una enfermedad glomerular causada por IC<sub>5</sub> formados in situ fue realizada mediante la fijación de un antígeno, IgG humana agregada, al mesangio de un conejo (131). Una vez fijado el antígeno, se transplantaba el riñón a un conejo normal y se le inyectaba IgG de conejo anti IgG humana, induciéndose una inflamación mesangial por la fijación del complemento e infiltración del polimorfonuclear exclusivamente en el riñón transplantado. Posteriormente, se ha desarrollado un modelo similar utilizando como antígeno ferritina conjugada con IgG y obviando el trasplante renal (191). Si se inyectaba el antisuero antiferritina a los 15 días de la inyección del antígeno cuando éste ya no está presente en la circulación, se observaba el depósito del antisuero en el mesangio glomerular, demostrándose de nuevo la accesibilidad de los antígenos depositados a anticuerpos circulantes.

Aunque hasta el momento no se ha descrito ninguna enfermedad humana en la cual ocurra algo parecido, este modelo puede ser muy interesante para explicar el desarrollo de enfermedades mesangiales agudas. En teoría cualquier antígeno puede ser atrapado en el mesangio y después de su eliminación de la circulación cuando se desarrolla una respuesta inmunológica suficiente, formarse IC<sub>5</sub> in situ y desencadenar todo un proceso inflamatorio. Hay otras situaciones experimentales asociadas con anomalías histológicas del mesangio pero no las discutiremos con detalle por falta de espacio. Únicamente nos detendremos en los modelos experimentales de nefropatías de IgA desarrollados recientemente.

#### *1.5.3.d. Modelos experimentales de nefropatía de IgA.*

Rifai y col. (167) demostraron por primera vez que la IgA polimérica era esencial para que

se desarrollara la nefropatía con depósitos mesangiales de IgA en ratones inyectados con IC<sub>3</sub> formados in vivo o in vitro. Aunque la nefritis se producía con IC<sub>3</sub> en exceso de antígeno o de anticuerpo, estos últimos eran los más apropiados para una localización mesangial.

Isaacs y col. (90), han descrito otro modelo de nefropatía de IgA en ratones inyectados con antígenos derivados del dextrano. Como es sabido, los polisacáridos provocan una estimulación policlonal de los linfocitos productores de inmunoglobulinas y secundariamente el depósito mesangial de IC<sub>3</sub> (164). Algunos de éstos, tales como el dextrano B 1355 derivado de la raza B 1355 de *Leuconostoc mesenteroides* o el pneumococo tipo III conjugado con DNP, producen una respuesta de anticuerpos del tipo IgA. Haciendo un paralelismo con lo que ocurre tras una infección respiratoria en los pacientes con la enfermedad de Berger (hematurias recidivantes), la estimulación policlonal que supone una infección viral o bacteriana puede producir una respuesta preferente de anticuerpos de IgA (¿polimérica?) contra determinados antígenos (polisacáridos procedentes de la membrana bacteriana o de la cápsula viral) y causar una nefropatía de IgA.

El tercer modelo se basa en provocar una nefropatía de IgA secundaria a una cirrosis inducida por tetracloruro de carbono (65). Previamente otros autores ya observaron que la ligadura parcial de la vena porta producía un depósito de IgA en el mesangio glomerular, poniendo de relieve la importancia del hígado en el aclaramiento de antígenos provenientes del tracto gastrointestinal y, posiblemente, de los IC<sub>3</sub> de IgA que vienen por esa ruta (210).

#### *1.5.3.e. Enfermedades humanas asociadas con alteraciones significativas del mesangio.*

La mayoría de las enfermedades glomerulares están acompañadas de anomalías mesangiales (137). Estas son más patentes en las enfermedades por IC<sub>3</sub> inducidas experimentalmente o que ocurren naturalmente, con la posible excepción de la nefropatía membranosa pura. Las alteraciones mesangiales suelen ser: proliferación, incremento de la matriz mesangial e hialinización. Además el mesangio es un sitio común de depósito de inmunoglobulinas y de factores del complemento en enfermedades como lupus eritematoso diseminado, glomerulonefritis post-estreptocócica, glomerulonefritis membranosa proliferativa y otras. En ciertas enfermedades como el síndrome nefrótico idiopático hay una proliferación mesangial de origen desconocido. En la nefropatía diabética también hay una notable expansión mesangial. En otras hay depósitos muy característicos y persistentes, determinados por inmunofluorescencia, de IgA y en menor grado de otras inmunoglobulinas y factores del complemento. Son la enfermedad de Berger y el síndrome de Schönlein-Henoch que desarrollaremos en el siguiente punto.

En cualquier caso, en la mayoría de las enfermedades renales, no se conoce cuál es la patogénesis de las lesiones y anomalías observadas en el mesangio y el depósito de IC<sub>3</sub> no siempre produce alteraciones funcionales importantes (50).

#### *1.5.3.f. Necesidad de estudiar los mecanismos de depósito de los IC<sub>3</sub> de IgA.*

A pesar de la ingente cantidad de trabajos acerca del papel de los IC<sub>3</sub> y de los mecanismos de depósito en diferentes tejidos, la exposición del punto 1.5 pone en evidencia la carencia casi absoluta de estudios acerca de los inmunocomplejos de IgA. Sin embargo, la enfermedad de Berger arriba mencionada representa el 20–30% de las glomerulonefritis biopsiadas en nuestro medio y aunque hasta ahora era considerada una enfermedad benigna, una buena parte de los enfermos pueden acabar en insuficiencia renal terminal (50). Por ello no se comprende el desinterés mostrado hasta ahora por desarrollar modelos experimentales y estudiar los mecanismos de depósito de los IC<sub>3</sub> de IgA, a no ser por el desconocimiento casi absoluto del papel de la IgA sérica y su relación con la IgA a nivel de las secreciones externas. La mejor comprensión de las propiedades biológicas de la IgA (ver 1.3) y el enorme avance que ha supuesto el conocer los mecanismos de transporte de la IgA polimérica (ver 1.4), su papel como eliminadora de antígenos a través del hígado, así como la idea, cada vez más generaliza-

da, de la existencia en las mucosas externas de un sistema inmunológico común, integrado a través del movimiento de las células y de los anticuerpos, hace cada vez más necesario conocer las disfunciones intrínsecas o extrínsecas al sistema, que posibilitan que se produzcan depósitos anormales de ICs de IgA potencialmente patogénicos para el individuo. Para ello hemos seguido un doble abordaje, profundizar en los mecanismos de depósito de la IgA en los tejidos comparándolo con el manejo de agregados de IgG. Por otro lado, comparar la unión y catabolismo de agregados de IgA monomérica o polimérica por el SMF y/o hepatocitos aislados con el manejo de las mismas proteínas sin agregar.

#### 1.6. Nefropatía mesangial de IgA.

Ciertas nefritis humanas como la enfermedad de Berger (9) y el síndrome de Schönlein-Henoch (143), se caracterizan por los elevados niveles séricos de IgA y la presencia constante de IgA, frecuentemente acompañada de C3 y/o otras inmunoglobulinas, en el mesangio glomerular con un patrón granular. Así mismo, en pacientes con cirrosis alcohólica se han encontrado niveles elevados de IgA sérica (92) y depósitos en el mesangio con idéntico patrón granular (10). Todos estos hechos sugieren que las tres enfermedades pudieran tener algunas características en común.

##### 1.6.1. *Papel de la IgA en la patogenia de la nefropatía de IgA.*

La importancia de la IgA en la patogénesis de las lesiones glomerulares se basó inicialmente en la observación de la recidiva de los depósitos granulares de IgA en los riñones transplantados a pacientes con la enfermedad de Berger o en el síndrome de Schönlein-Henoch (6 y 11). Algunos autores no han encontrado niveles anormales de la IgA sérica en la enfermedad de Berger (122) aunque parece ser una característica muy generalizada (11, 50 y 114). Los pacientes con el síndrome de Schönlein-Henoch o con nefropatía de IgA secundaria a una cirrosis alcohólica también tienen concentraciones de IgA elevada siendo mayores en los cirróticos, seguido de la enfermedad de Berger y el síndrome de Schönlein-Henoch.

Aunque la posibilidad de que hubiera una IgA anormal había sido sugerido por diversos autores (11 y 114), no se conocía ningún estudio detallado de las características bioquímicas e inmunológicas de la IgA sérica y depositada en el mesangio glomerular en la enfermedad de Berger. Investigaciones realizadas en nuestro laboratorio, sugieren la existencia de elevados niveles séricos de IgA polimérica, parcialmente como inmunocomplejos (121). Otros autores han descrito la presencia de un número anormal de linfocitos circulantes portadores de IgA (148), una disminución en la actividad de las células T-supresoras específica para la IgA (173) y un aumento de los linfocitos T $\alpha$  (con receptores para el Fc de la IgA) con actividad cooperadora (172). Nosotros hemos podido confirmar la falta de actividad supresora de los linfocitos T de estos pacientes, aunque no se trata de un fenómeno generalizado ya que afecta al 40% de los pacientes (45). Estos datos junto con el aumento observado en la relación OKT4+ / OKT8+ (linfocitos T cooperadores / linfocitos T supresores y citotóxicos) (28 y 46), sugieren que el incremento de los linfocitos T cooperadores podría ser un fenómeno previo a las anomalías observadas en la actividad de los linfocitos T supresores.

También es posible que la IgA en forma de ICs o de IgA polimérica pueda modular la actividad de los linfocitos T supresores a la luz de los recientes hallazgos: La IgA polimérica es capaz de inducir un aumento de los linfocitos T con fenotipo de células supresoras (80) y la estimulación policlonal in vitro de los linfocitos de pacientes con la enfermedad de Berger no sólo provoca un aumento de la IgA total sino que también aumenta la IgA polimérica (46). Es posible que en los pacientes con esta enfermedad se dé un fenómeno similar tras la estimulación policlonal in vivo (infección microbiana).

Tampoco podría excluirse totalmente un defecto en el aclaramiento de la IgA polimérica a través del hígado, agravado por la hiperproducción de IgA (ver 3.1). Cualquiera que sea el defecto

primario, la persistencia de la IgA en el mesangio glomerular en biopsias iterativas, incluso al cabo de muchos años, es una característica de la nefropatía mesangial de IgA y sin embargo la naturaleza y origen de la IgA depositada no está totalmente dilucidada.

Debido a que la enfermedad se produce a menudo acompañada de infecciones del tracto respiratorio o gastrointestinal, parecía probable que la IgA depositada proviniera de las secreciones externas. Sin embargo solamente se ha encontrado de forma ocasional el depósito de la IgA secretoria (134). Algunos autores han tratado de saber si la IgA depositada en el mesangio glomerular era de origen periférico o secretorio estudiando la subclase de IgA (3 y 33). Como ya hemos dicho en 1.2.3. el 90% de la IgA sérica pertenece a la subclase IgA1 mientras que en las secreciones externas solamente el 50%. Sin embargo la prevalencia de una subclase u otra en un lugar determinado, nada nos dice en principio acerca de su origen ni de su tamaño. Ambas subclases pueden formar polímeros de IgA con igual facilidad ya que la IgA secretoria tiene polímeros de las dos subclases y en la misma proporción; por otro lado parte de la IgA secretoria tiene un origen sistémico (ver 1.4.) y viceversa, parte de la IgA polimérica del suero se produce localmente en las células plasmáticas subepiteliales independientemente de la subclase de IgA. Además, los linfocitos periféricos son capaces de producir IgA polimérica de las dos subclases (46, 112) y es conocida la capacidad de los linfocitos precursores de la IgA de migrar a través de la sangre, desde el tejido linfoide asociado a los bronquios y al intestino, hasta otros tejidos secretorios alejados de aquellos, tales como las glándulas mamarias, salivares o tejidos genito-urinarios (136).

Los resultados obtenidos por nosotros en el suero de estos pacientes (121) y la importancia adquirida por la IgA polimérica en el desarrollo de las glomerulonefritis de IgA, al menos en ratones (167) nos decidió a investigar si la IgA depositada en el mesangio de los pacientes con la enfermedad de Berger o con cirrosis alcohólica y nefropatía de IgA, era también polimérica. (Ver resultados en 3.1.).

#### 1.6.2. Presencia de inmunocomplejos.

El depósito granular de la IgA en el mesangio en las tres enfermedades, sugería el depósito de inmunocomplejos (ICs) circulantes. Sin embargo los primeros intentos de encontrar ICs fueron infructuosos, tanto en la enfermedad de Berger (40, 180 y 201) como en el síndrome de Schönlein-Henoch (18). En la cirrosis alcohólica se habían detectado ICs de IgG (5, 101, 157, 195 y 220) pero solamente en dos trabajos tenían además ICs de IgA (157 y 220).

El desarrollo de técnicas específicas para la detección de ICs de IgA (99 y 119) ha confirmado su presencia. Nuestro grupo fue uno de los primeros en describir la presencia de ICs de IgA en pacientes con la enfermedad de Berger (121), mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (5-40%) a pH 7,4 y pH 2,8. Siguiendo en esta línea hemos desarrollado 4 nuevas técnicas para detectar ICs de IgA de diferentes tipos (activadores del complemento o no, de IgA monomérica o polimérica y con actividad de anticuerpo específico contra antígenos de origen alimenticio). También hemos estudiado el efecto de la difenilhidantoína (droga que inhibe la síntesis de la IgA) sobre los ICs (4.2). Otros autores han demostrado que en la nefropatía de IgA hay ICs de IgA por diversas técnicas (183 y 220) y en congresos recientes se han presentado varias comunicaciones al respecto (34, 41, 75, 89 y 204). En ninguna de ellas se establecía claramente la importancia real de ese hallazgo, aunque en una de ellas (204) había una buena correlación con el estado clínico de los pacientes, encontrando ICs de forma intermitente coincidiendo con la aparición de microhematuria.

#### 1.6.3. Factores de riesgo.

La enfermedad de Berger es la enfermedad glomerular más frecuente en nuestro medio (20-30% de las glomerulonefritis biopsiadas). Aunque hasta hace poco tiempo era considerada una en-

fermedad benigna, estudios más cuidadosos sobre los riñones terminales, antes diagnosticados de nefrosclerosis o pielonefritis, han mostrado que muchos de estos casos al estudiarlos por inmunofluorescencia, eran verdaderas glomerulonefritis mesangiales de IgA.

La alta frecuencia de esta glomerulonefritis en los países latinos, Australia y Japón, en contraste con una menor prevalencia en Estados Unidos e Inglaterra (50), sugiere que puede haber factores geográficos o genéticos relacionados con la enfermedad. Por otro lado también se ha observado en los familiares de pacientes un aumento de linfocitos portadores de IgA (174). Nosotros hemos observado que los familiares de estos enfermos tienen elevados los niveles de IgA polimérica en muchas ocasiones (datos no publicados).

Estudios recientes de los antígenos del sistema de antígenos del HLA, han mostrado un aumento de la frecuencia del antígeno HLA-Bw35 (13 y 146), pero otros autores no han confirmado estos hallazgos (48 y 50). Para algunos, la presencia del antígeno BW35 constituye un factor de riesgo para el desarrollo de la insuficiencia renal e incluso han encontrado relación con el grado de esclerosis glomerular (156) o con la presencia de inmunocomplejos (135).

## 2. OBJETIVOS.

La nefropatía de IgA (o glomerulonefritis mesangial IgA) descrita por Berger en Francia en 1969, se caracteriza por la existencia de depósitos granulares en el mesangio, frecuentemente acompañados de C3 y/o otras inmunoglobulinas. Clínicamente suele asociarse a hematurias macroscópicas recidivantes, en la mayoría de los casos (a veces sólo alteraciones asintomáticas de la orina) con una lenta evolución hacia la insuficiencia renal. El síndrome de Schönlein-Henoch se caracteriza por presentar depósitos de IgA en el mesangio en un alto porcentaje de casos acompañados de otros síntomas como púrpura, artritis y dolores abdominales. En los últimos años se ha descrito que más del 60% de los pacientes con cirrosis alcohólica presentan en el glomérulo renal depósitos de IgA de manera granular indistinguibles de las dos entidades antes comentadas.

En la presente Tesis se ha pretendido profundizar en los aspectos inmunológicos que intervienen en la patogenia de la nefropatía de IgA.

2.1. En las tres enfermedades existen frecuentemente niveles séricos elevados de IgA por lo que se piensa que podrían estar patogénicamente relacionadas. En nuestro laboratorio se describió por primera vez en la literatura la existencia de niveles elevados de IgA polimérica en la mayoría de los pacientes con la enfermedad de Berger (121).

El primer objetivo ha sido el de tratar de demostrar que en el síndrome de Schönlein-Henoch y en la nefropatía de IgA secundaria a la cirrosis alcohólica hay un aumento de la IgA polimérica sérica al igual que en la enfermedad de Berger. Por otro lado averiguar si parte de la IgA depositada en el mesangio de los pacientes de las tres enfermedades es polimérica, lo que reforzaría la idea de que son entidades muy relacionadas y con una patogénesis común (ver resultados en sección 4.1.).

2.2. Muchas de las características clínicas e inmunopatológicas arriba apuntadas sugieren el depósito glomerular de inmunocomplejos de IgA. Sin embargo la mayoría de las técnicas utilizadas hasta ahora han fracasado en detectar inmunocomplejos circulantes debido a que no se han utilizado técnicas específicas para la clase IgA. Por otro lado los inmunocomplejos circulantes tienen un papel controvertido.

El segundo objetivo ha sido el de investigar si los pacientes con la nefropatía de IgA tienen inmunocomplejos en la circulación, a qué clase pertenecen (IgG ó IgA) y qué relación tienen con las manifestaciones clínicas, analíticas (elevación de la IgA sérica total y polimérica, microhematuria y proteinuria) y evolutivas de la enfermedad. Se han estudiado por cuatro métodos capaces de detectar inmunocomplejos de IgA con características inmunoquímicas y biológicas diferentes. También se ha estimulado antigénicamente (dieta hiperproteica) a un grupo de pacientes y controles con el fin de saber si existe un defecto en el aclaramiento de inmunocomplejos por parte del hígado, dado su papel central en la eliminación de inmunocomplejos de IgA polimérica (hepatocitos) ó de IgG (células de Kupffer). Por último se ha estudiado el efecto de la difenilhidantoína, droga que inhibe selectivamente la síntesis de IgA, sobre los inmunocomplejos en la enfermedad de Berger. (ver resultados en 4.2.).

2.3. La mayoría de nuestro conocimiento de las propiedades biológicas o efectoras de las inmunoglobulinas en realidad corresponden a la clase IgG ó IgM. Se creía que la IgA sólo tenía un papel en las secreciones externas por ser la inmunoglobulina predominante. Sin embargo recientemente se ha visto que la IgA sérica, fundamentalmente polimérica, tiene un papel modulador de los efectos biológicos de las otras inmunoglobulinas, propiedades antiinflamatorias directas como la inhibición de la quimiotaxis y el poder bactericida de polimorfonucleares. Por el contrario se ha demostrado que estimula la liberación de enzimas lisosómicos y aumenta sinérgicamente la actividad citotóxica dependiente de anticuerpos. No es posible todavía saber



cómo el aumento de la IgA polimérica (en forma de inmunocomplejos o no) influye en las tres enfermedades antes mencionadas.

Por ello, *el tercer objetivo* ha sido el estudiar el efecto del suero y de la IgA sérica en los pacientes con la enfermedad de Berger sobre algunas funciones de los polimorfonucleares como la quimiotaxis o movimiento dirigido y la fagocitosis (ver resultados en sección 4.3.).

2.4. Se cree que los inmunocomplejos circulantes pueden causar glomerulonefritis en los animales y en el hombre dependiendo de su composición y tamaño, así como de otros factores como aumento de la vasopermeabilidad, capacidad de activar el complemento y disminución de la actividad fagocitaria del sistema mononuclear fagocítico. Algunos autores han sugerido otros mecanismos de depósito glomerular como son la formación in situ de inmunocomplejos, el papel de la carga de la membrana basal glomerular, la importancia del antígeno, y de los carbohidratos de las inmunoglobulinas. Sin embargo la mayoría de los trabajos realizados se han basado en el estudio de inmunocomplejos o agregados de IgG o IgM. Poco se conoce acerca del manejo de los inmunocomplejos de IgA por el sistema mononuclear fagocítico.

*El cuarto objetivo* ha sido el estudiar los mecanismos de depósito de la IgA en el mesangio glomerular, subdividiéndolo en dos apartados: por un lado comparar el manejo por el sistema mononuclear fagocítico de agregados de IgA (equivalentes en muchos aspectos a verdaderos inmunocomplejos) con el manejo de agregados de IgG. Por otro lado estudiar los mecanismos de unión y catabolismo de los agregados de IgA polimérica por el sistema mononuclear fagocítico y por hepatocitos aislados comparándolos con agregados del mismo tamaño de IgA monomérica y ambas proteínas sin agregar (resultados en 4.4.).

En resumen, pretendemos conocer la patogenia de un nuevo grupo de enfermedades ligadas a la IgA.

### 3. METODOS.

#### 3.1. Técnicas generales.

##### 3.1.1. *Inmunodifusión doble dimensional.*

Se utilizó el método de Ouchertlony (154) con placas de agar (Difco-Bacto Agar Noble) al 1% en PBS. En cada placa se hicieron unos pocillos enfrentados de forma que el antígeno y el anticuerpo depositados en ellos pudieran migrar uno hacia el otro y formar una línea o banda de precipitación cuando alcanzaron el punto de equivalencia. Para ello se incubaron 18 h. a temperatura ambiente ó 3 h. a 37° C en una cámara húmeda.

##### 3.1.2. *Inmunodifusión radial.*

Se utilizó el método de Mancini y col. (127) con placas comerciales (Kallestad, USA) que ya tenían incorporado el antisuero. Se construyó una curva de calibrado con concentraciones conocidas del antígeno, utilizando al menos tres pocillos. El resto se llenó con 2,5 µl. de soluciones de antígeno de concentraciones desconocidas. Se dejó la placa en una cámara húmeda  $18 \pm 1/2$  horas y se determinó el diámetro de cada anillo con una lupa dotada de una escala micrométrica. Como la concentración del antígeno está relacionada con el diámetro del anillo de precipitación, se representó gráficamente el diámetro obtenido frente al logaritmo de la concentración del antígeno de las soluciones standard. Los puntos se ajustaron a una recta y se obtuvo la concentración de las muestras desconocidas mediante esta curva de calibrado.

##### 3.1.3. *Inmunoelectróforesis.*

Se realizó por el método de Grabar y Williams (67) utilizando placas (11 x 15 cm.) de gel de agarosa al 1,5% en solución tampón veronal 0,035 M, pH 8,6 (Kallestad). En cada pocillo se pusieron 3 µl. de la muestra a identificar alternando con un suero humano normal que servía de referencia. A este suero se le añadió una gota de azul de Coomassie para ver migrar la albúmina. Se corrieron las muestras en una cubeta de electroforesis, que tenía un litro de tampón veronal 0,05 M pH 8,6, durante una hora  $\pm$  30 min. a una intensidad de 100 voltios (6 V/cm.). Transcurrido ese tiempo se pusieron 100 µl. de diferentes anticuerpos específicos en las seis trincheras disponibles y se incubaron durante  $18 \pm 3$  h. en una superficie plana, a temperatura ambiente y en una atmósfera saturada de humedad. Después se observaron los arcos de precipitación y se procedió a la tinción. Para ello, las placas se lavaron con solución salina 0,15 M pH 7,3 (dos o tres veces durante 24-48 horas) para eliminar las proteínas no precipitadas. Se trasladaron a un recipiente con agua destilada y se agitaron durante 4-6 h. para eliminar el ClNa del gel. Se dejaron secar a temperatura ambiente hasta obtener una fina película de agarosa y se tñieron cubriéndolas con una solución de azul-brillante de Coomassie al 0,5% durante un par de minutos. Después se decoloraron con una solución de etanol al 95%, ácido acético al 5% durante 30-60 min., hasta que sólo quedaron teñidas las bandas de precipitación.

##### 3.1.4. *Marcaje de proteínas.*

###### 3.1.4.a. *Método de la Cloramina-T.*

Se utilizó el método de Hunter y Greenwood, (86), para obtener actividades específicas muy altas (para el RIA) y las modificaciones de McConahey y Dixon (132) para pruebas biológicas en las que se necesitaron actividades específicas más bajas y con un mínimo de desnaturalización.

En el primero de los casos, 50–100  $\mu\text{g}$ . de proteínas (en un volumen de 25–50  $\mu\text{l}$ . de tampón fosfatos 0,05 M pH 7,3) se incubaron con 1 mCi de  $^{125}\text{I}$  (en 20  $\mu\text{l}$ . de tampón fosfatos 0,5 M pH 7,3) y 100  $\mu\text{g}$ . de cloramina T (1 mg./ml.) durante 40 segundos a temperatura ambiente, y 1 min. a 4°C. La reacción se paró añadiendo la misma cantidad de metabisulfito sódico y un exceso de IK (200  $\mu\text{l}$ . de IK 1M) con BSA al 1%. La muestra se dializó o se pasó por una columna de Sephadex G-25 equilibrada con PBS y BSA al 0,5%.

En el 2º caso, se aumentó la cantidad de proteína a marcar o bien se aumentó el volumen hasta 1 ml. Las demás condiciones eran idénticas.

#### 3.1.4.b. Método de la lactoperoxidasa.

Se utilizó glucosa oxidasa como generador de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La lactoperoxidasa en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  cataliza la sustitución del yoduro ( $^{125}\text{I}^-$ ) por iones hidrógeno en los grupos fenólicos de la tiroxina (84 y 85). Se usaron de 50  $\mu\text{g}$ . a 1 mg. de proteína en un volumen de 100–1000  $\mu\text{l}$ . (dependiendo de la actividad específica deseada) de tampón fosfatos 0,05 M pH 7,3, sin ningún tipo de preservativo para evitar la inhibición de la reacción enzimática. Esta cantidad se incubó con 50  $\mu\text{l}$ . de un gel de poliacrilanida que tenía incorporada previamente la lactoperoxidasa y la glucosa oxidasa (Enzymobead, BioRad, USA), 1 mg. de  $^{125}\text{I}\text{Na}$  en 20  $\mu\text{l}$ . de tampón fosfatos 0,5 M pH 7,3 y 150  $\mu\text{l}$ . de glucosa al 2% (3 mg.), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 3.000 r.p.m., 10 min. y el sobrenadante se aplicó a una columna de Sephadex G-25 equilibrado con PBS pH 7,3 y BSA al 0,5%. Alícuotas de 10  $\mu\text{l}$ . de las fracciones obtenidas se midieron en un contador  $\gamma$  y aquellas fracciones en las que se obtuvo más del 90% de las cpm en el precipitado (después de la precipitación con TCA al 10%) se guardaron a 4°C hasta su uso.

#### 3.1.5. Reducción y alquilación.

Se utilizó como reductor 1,4 ditiotretitol 0,01 M en tampón Tris 0,6 M–EDTA 0,001M, pH 8,1 y se incubó con la solución proteica (10–20 mg./ml.), durante 1 hora a temperatura ambiente. La alquilación se realizó añadiendo iodoacetamida (0,025 M final) en el mismo tampón e incubando 15 min. a 4°C. (69).

### 3.2. Aislamiento de proteínas.

#### 3.2.1. Aislamiento de IgA humana polimérica y monomérica.

Sueros de mielona de IgA (158) con concentraciones elevadas de IgA monomérica y polimérica se diluyeron 1/2 con PBS y fueron precipitados con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 50% (P/V). Las proteínas precipitadas (fracción  $\gamma$ -globulínica) se centrifugaron, redisolviéron y dializaron frente a tampón fosfatos 0,015 M pH 7,5. La solución proteica se cromatografió en una columna de celulosa DEAE (DE-52, Whatman) equilibrada en el mismo tampón. La mayor parte de la proteína que no se unió a la matriz cargada pertenecía a la clase IgG. La IgA monomérica se eluyó con tampón fosfatos 0,05 M pH 7,0 y la IgA polimérica mediante un gradiente de molaridad desde fosfatos 0,05M pH 7,0 hasta NaCl 0,2 M en fosfatos 0,05 M pH 7,5. La IgA monomérica y polimérica eluidas se dializaron frente a PBS, se concentraron, y se cromatografiaron en una columna (2,6 x 70 cm., Pharmacia) de Ultrogel AcA 34 y a AcA 22 respectivamente (LKB Instruments Ltd., Bromma, Suecia). Las dos preparaciones purificadas se concentraron a 10 mg./ml. y se analizaron por inmunoelectroforesis. El peso molecular se estimó mediante filtración en gel con una columna K 26/70 de Ultrogel AcA 22 previamente calibrada con los marcadores siguientes: azul dextrano (Vo), tiroglobulina (669.000 D), ferritina (440.000 D), catalasa (200.000 D), IgG (150.000 D).

### 3.2.2. Aislamiento de IgM humana.

La IgM de un suero de mieloma de IgM se separó del resto de las proteínas séricas mediante diálisis frente a agua destilada. El precipitado euglobulínico se diluyó en PBS y se sometió a filtración en gel con una columna K 26/70 de Ultrogel AcA 22; equilibrada con PBS. Las fracciones donde eluyó la IgM se identificaron por inmunodifusión doble frente a un antisuero anti-cadenas  $\mu$  monoespecífico. Las fracciones de IgM se concentraron bajo presión negativa y se analizó su pureza mediante inmunoelectroforesis a una concentración de 10 mg./ml.

### 3.2.3. Aislamiento de IgG de conejo y de IgG humana.

Se utilizó el método de Reif (165). La IgG de conejo se obtuvo de un suero de conejo normal, se precipitó con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 50% pH 7,4, se dializó frente a tampón fosfatos 0,01 M pH 7,5 y se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna de DEAE celulosa (DE-52 Whatman) equilibrada con tampón fosfatos 0,01 M pH 7,5. (5 g. de DE-52 por cada ml. de suero).

En el caso de la IgG humana el tampón utilizado fue fosfatos 0,01 M pH 8,0. La pureza de la IgG se comprobó por inmunodifusión doble dimensional y electroforesis a la concentración de 10 mg./ml.

### 3.2.4. Aislamiento del componente secretorio (SC).

Se utilizó el método de Underdown y col (202).

#### 3.2.4.a. Formación de un inmunoadsorbente de IgM-Sepharosa.

La IgM se dializó frente al tampón de unión (carbonato / bicarbonato 0,1 M NaCl 0,5 M pH 8,5) y se utilizó a la concentración de 10-15 mg./ml. de gel. La Sepharosa 4B activada con BrCN, (Pharmacia) se hidrató y lavó con HCl 1 mM (200 ml./g.). Después se lavó exhaustivamente con el tampón de unión y se incubó con la Ig M durante 2 h. a temperatura ambiente. Los posibles grupos activos libres, fueron inactivados con una incubación con etanolamina 1 M pH 8,0 durante 2-3 h. a temperatura ambiente y la proteína unida no covalentemente se eluyó mediante lavados sucesivos con tampón borato 0,1 M - NaCl 0,5 M pH 8,0 y acetato 0,1 M - NaCl 0,5 M pH 4,0. Finalmente la IgM-Sepharosa se resuspendió en PBS con azida el 0,05% y guardó a 4° C hasta su uso. El 90-95% de la IgM se unió a la Sepharosa.

#### 3.2.4.b. Aislamiento del SC libre.

Las proteínas del calostro humano (3-8 días después del parto) se obtuvieron por centrifugación a 48.000 g durante 1 h. a 4° C. La capa de grasas solidificada quedó en la parte de arriba, se quitó suavemente para decantar la fase intermedia donde se encontraban las proteínas no precipitadas. Se diluyó la fracción proteica del calostro al 1/9 con tampón citrato 0,01 M pH 6,8 conteniendo  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,25 mg./ml. de calostro diluido). Se agitó durante 2 h. a 4° C, después se añadió IgM-Sepharosa (6-16 mg. IgM por cada ml. de calostro sin diluir) y se agitó de nuevo la mezcla durante 3 h. a 4° C. Esta se empaquetó en una columna de cromatografía y después de la elución de la proteína no adsorbida, la IgM-Sepharosa se lavó con PBS hasta que la absorbancia a 280 nm era menor a 0,02. La proteína adsorbida se eluyó con KSCN 1 M tampón fosfatos 0,01 M, pH 7,0. Después de la diálisis y concentración, la proteína eluida contenía SC libre, lactoferrina y IgA secretoria y otras proteínas no identificadas por IEF. El eluido se aplicó a una columna de Ultrogel AcA 22 o AcA 34 equilibrada con PBS a 4° C. Eluyeron dos picos, el segundo contenía el SC

libre ligeramente contaminado (2-3%) con lactoferrina. En algunos casos el 2º pico se pasó por un inmunoabsorbente de antilactoferrina-Sepharosa.

### 3.3. Metodología utilizada para el estudio de los pesos moleculares de la IgA sérica o depositada en el mesangio glomerular.

#### 3.3.1. Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

El gradiente (5-40% peso/volumen) se realizó mediante un formador de gradientes (Isco, USA) en tubos de nitrato de celulosa de 5 ml. de volumen (Beckman). La sacarosa se disolvió en tampón Tris-HCl 0,15 M pH 7,4 o en glicina - HCl 0,15 M pH 2,8. Se aplicaron alícuotas de 500 µl. del eluido renal (ver 3.3.6.) o 50 µl. de suero diluido 1/10. Se centrifugaron a 170.000 g. durante 16 h. a 4º C en una ultracentrifuga Spinco L-2 de Beckman con un rotor SW-50.1. Se utilizaron como marcadores IgM (coeficiente de sedimentación: 19 S), IgG (7 S) y albúmina sérica bovina (BSA 4,5 S). Se recogieron fracciones de 200 µl. a partir del final del tubo. Las fracciones que estaban en glicina - HCl pH 2,8 se neutralizaron inmediatamente a pH 7,4 añadiendo 30 µl. de Tris 0,2 M. A cada fracción se le añadieron 1,5 ml. de tampón borato salino 0,15 M pH 8,0 y se leyó en un espectrofotómetro a 280 nm de longitud de onda. En cada fracción la concentración de IgA se midió por radioinmunoensayo (ver 3.3.2.). La concentración de IgA (en ng./ml.) de cada fracción se representó gráficamente en papel milimetrado frente al nº de fracción. La superficie total y las zonas entre 5-9 S, 9-13 S, 13-17 S y 17-21 S, determinadas por la posición de los marcadores, se calcularon por planimetría. Las áreas se expresaron como el porcentaje respecto al área total.

#### 3.3.2. Cuantificación de la IgA por radioinmunoanálisis (RIA).

Se realizó mediante un RIA de doble anticuerpo (121). Se utilizó como primer anticuerpo un antisuero de conejo específico contra cadenas alfa humanas, a la dilución que unió aproximadamente el 50% del antígeno marcado con  $^{125}\text{I}$  ( $^{125}\text{I}$ -IgA). Se incubaron durante 2 horas 100 µl. de las fracciones del gradiente con 100 µl. del primer anticuerpo, después se añadieron 100 µl. de  $^{125}\text{I}$ -IgA y suero de conejo normal y se incubaron otras 2 h. a temperatura ambiente. El complejo  $^{125}\text{I}$ -IgA-anti IgA se precipitó con 100 µl. de un suero de cordero anti-IgG de conejo (en equivalencia respecto a la IgG de conejo) incubando durante 16 h. a 4º C. Después se centrifugaron las muestras a 3.000 rpm durante 10 minutos, se decantaron, se lavaron dos veces con 0,15 M BBS-BSA 0,2% pH 8,0 y se midió la radioactividad de los tubos en un contador  $\gamma$ . Se construyó una curva de inhibición standard con concentraciones conocidas de IgA no marcada. Las condiciones del análisis permitieron detectar concentraciones de IgA entre 8,5 y 200 ng./ml.

#### 3.3.3. Técnicas auxiliares del RIA.

##### 3.3.3.a. Obtención de suero de cordero anti-IgG de conejo.

El protocolo de hiperinmunización fue el siguiente. IgG de conejo aislada y purificada (según 3.2.3.) a la concentración de 1 mg./ml., se agregó por el calor a 69º C durante 60 minutos. A 2 mg. de IgG agregada (A-IgG) se le añadió un volumen idéntico de adyuvante completo de Freund y se inyectó i.m. al cordero. A las 7 semanas se inyectó i.p. 10 mg. de A-IgG y al día siguiente 2 mg. i.v. en 10 ml. de salino. Al inicio de la 8ª semana se sacó una pequeña muestra para ver el título del antisuero y cuando alcanzó el máximo, se sacaron 500 ml. de sangre y se dejaron coagular durante 2 h. a temperatura ambiente. Se centrifugó a 3.000 rpm durante 15 min. Se obtuvo el suero que se guardó en alícuotas a -20º C con azida al 0,05% hasta su uso.

### 3.3.3.b. Valoración del 2.<sup>o</sup> anticuerpo.

Para valorar el 2.<sup>o</sup> anticuerpo, se hizo primero una curva de precipitación cuantitativa con una concentración fija del antisuero y diluciones crecientes del suero de conejo no inmune utilizado como portador. Una vez determinado el punto de equivalencia fue necesario investigar la potencia del antisuero. Para ello se hicieron diluciones seriadas del antígeno y del antisuero manteniendo la misma relación molar entre ellos. Se midió por espectrofotometría la concentración proteica del precipitado y se escogió la dilución anterior al inicio de la disminución de la densidad óptica. De la misma forma se determinó la dilución máxima capaz de precipitar el 100% del anticuerpo unido al antígeno.

### 3.3.3.c. Valoración del 1.<sup>er</sup> anticuerpo.

La definimos arbitrariamente, con el fin de poder comparar entre diferentes antisueros, como la dilución de anticuerpo requerida para unir el 50% del antígeno para una concentración fija de éste. Para calcularlo se hicieron diluciones seriadas del 1.<sup>er</sup> anticuerpo (en este caso suero de conejo anticadenas alfa humanas) para una concentración fija del antígeno (IgA) marcado con <sup>125</sup>I. Se incubó a temperatura ambiente hasta alcanzar el equilibrio (aproximadamente 2 h.) y después se separó el complejo Ag-Ac del Ag libre precipitando con un 2.<sup>o</sup> anticuerpo previamente valorado añadiendo (con el 1.<sup>er</sup> anticuerpo) suero de conejo normal como portador. (Siempre utilizamos como volumen final 0,4 ml). Se dejó incubar 16 h. a 4°C y se centrifugaba a 3000 rpm. 15 min., lavando dos veces con BBS 0,15 M pH 8,0 con BSA 0,2%. Las diluciones del antisuero y el Ag se realizan con este mismo tampón.

### 3.3.3.d. Afinidad del 1.<sup>er</sup> anticuerpo.

Se midió para ver indirectamente la sensibilidad potencial del RIA. La afinidad de un anticuerpo se define como la suma de las fuerzas no covalentes atractivas y repulsivas, resultantes de la interacción del sitio de unión del anticuerpo y el correspondiente determinante antigénico en el equilibrio. Una forma de determinar la afinidad del primer anticuerpo es la de obtener el título del mismo, con concentraciones proporcionalmente decrecientes del Ag. La dilución del antisuero a la que se une el 50% del Ag debe ser inversamente proporcional a la concentración del Ag. Gráficamente en una escala logarítmica habría una correlación lineal con la concentración del antígeno. La pendiente de la recta es una medida de la afinidad del anticuerpo, y cuanto mayor sea ésta, la concentración del Ag puede ser disminuida sin afectar a la eficiencia de la unión.

### 3.3.3.e. Construcción de la curva standard.

Se construyó fijando la concentración del Ag dentro del límite de sensibilidad del 1.<sup>er</sup> anticuerpo (generalmente alrededor del 50% de la unión) y cambiando las concentraciones del Ag no marcado. Gráficamente se expresó en coordenadas semilogarítmicas, las cpm de Ag marcadas en función de la concentración de Ag frío. Como esta función es inversamente proporcional a la concentración, y de carácter exponencial, al expresarlo en papel semilogarítmico obtendremos una recta.

### 3.3.4. Afinidad por el componente secretorio del suero y los eluidos renales.

El componente secretorio libre (SC) fue aislado según la técnica de Underdown y col (202) (ver 3.2.4.). La medida de la afinidad del SC por la IgA polimérica en el suero o en los eluidos se basó en el método de Brandtzaeg (20) modificado parcialmente por nosotros. Para quitar la IgM, que también tiene afinidad por el SC, las muestras se incubaron previamente con un inmunoabsorbente formado por un suero anti-IgM humana unido a una matriz insoluble de agarosa (Sephacosa 4B

Pharmacia, Uppsala, Suecia) en exceso de anticuerpo. Después de dos horas de incubación, se centrifugaron a 100 g, durante 10 minutos y el sobrenadante se incubó durante dos horas con  $^{125}\text{I}$ -SC (marcado por el método de la lactoperoxidasa), con una actividad específica de 0,5–1 mci/mg. La relación molar SC: IgA era mayor que 1:7,5. Para obtener estas condiciones en las que un pequeño incremento de IgA polimérica podía ser detectado, se construyó previamente una curva estándar con cantidades crecientes de la fracción 9–13S de un suero humano normal sin IgM frente a una cantidad fija de  $^{125}\text{I}$ -SC. El complejo  $^{125}\text{I}$ -SC-IgA era separado del  $^{125}\text{I}$ -SC libre mediante filtración en gel o ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (ver 3.3.1.).

### 3.3.5. Detección de la IgA polimérica depositada en el mesangio glomerular.

Las biopsias renales eran congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de utilizarlas. Secciones de 3 micras eran cortadas en un criostato y después de depositarlas en un porta objetos, eran teñidas con antisueros comerciales anti IgG, IgA, IgM, C3 y C4, fibrinógeno y albúmina humanas (Meloy Laboratorios, Springfield, Virginia). La monoespecificidad de los antisueros fue confirmada por inmunoelectroforesis. Suero de conejo anti-SC (conjugado con fluoresceína) fue obtenido de Dakopatts (Dinamarca). La pureza y especificidad del reactivo se determinó de la siguiente forma: mediante inmunoelectroforesis y inmunodifusión doble no dio reacción de precipitación contra SHN, IgA IgG, y cadenas ligeras K y  $\lambda$ , pero sí reaccionó con SC libre aislado y con calostro humano. El antisuero fue todavía purificado pasando por una columna de Sepharosa 4B conjugada con IgA humana, IgG y cadenas K y  $\lambda$ . El antisuero resultante sólo dio una línea de precipitación con el SC libre.

Para ver si había IgA polimérica depositada en el mesangio glomerular, cortes de riñón eran incubados con SC purificado en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Se utilizaron varias concentraciones de SC (10–500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y diferentes períodos de incubación hasta determinar las condiciones óptimas. Después de esto, todos los experimentos se hicieron con 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de SC y 30 min. de incubación. Una vez lavados, los cortes eran incubados con el antisuero anti-SC marcando con fluoresceína (a una dilución 1/15 con salino) durante otros 30 min. Se utilizaron como controles pacientes con otras nefropatías, con o sin depósitos de IgA, y secciones de riñones humanos normales. Como control positivo, se utilizó un grupo de pacientes con depósitos difusos de IgM.

### 3.3.6. Elución de las inmunoglobulinas depositadas en el riñón.

Se utilizaron riñones de autopsias hechas 10 horas después de la muerte de pacientes con una enfermedad alcohólica hepática manifiesta. En los seis casos estudiados había depósitos de IgA en el mesangio glomerular detectados por inmunofluorescencia (algunos tenían también depósitos de IgG y/o C3 pero nunca IgM).

La corteza renal se separó de la médula, se pesó en una balanza de precisión, homogeneizó con un homogeneizador de aspas y lavó varias veces con salino tamponado (PBS) pH 7,4, hasta que el sobrenadante tenía una densidad óptica menor que 0,02 a 280 nm de longitud de onda. El sedimento que contenía la corteza se mezcló con Glicina-HCl pH 2,8 (1:10 v/v) y se incubó durante una hora a  $4^{\circ}\text{C}$  con agitación constante. Después de una centrifugación a 2000 g durante 15 min, el sobrenadante se neutralizó con NaOH 0,5M y después dializó contra PBS durante una noche. Los precipitados que se formaron durante este período se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante era concentrado a 1 ó 2 volúmenes mediante presión negativa. La concentración total de proteínas se midió por el método de Lowry (123). La presencia de inmunoglobulinas en el eluido concentrado se detectó por inmunodifusión, inmunoelectroforesis y inmunodifusión doble. La fracción  $\gamma$ -globulínica del eluido se obtenía por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 50% (P/V) pH 7,4. Después, las muestras se dializaron y guardaron en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Como control se utilizó, de igual forma, un riñón de autopsia de un paciente con cirrosis hepática pero sin

depósitos de inmunoglobulinas en el glomérulo.

### 3.4. Métodos para la detección de inmunocomplejos.

Se han desarrollado muchos métodos para detectar inmunocomplejos en la circulación. La mayoría de las veces no se conoce el antígeno que forma parte de los ICs, por lo que casi todos los métodos que se han desarrollado se basan en distinguir el anticuerpo en forma de complejo del anticuerpo libre. Los métodos basados en las propiedades fisicoquímicas tratan de detectar cambios en el tamaño (por ultracentrifugación o filtración en gel), solubilidad (precipitación con PEG) o carga del anticuerpo. En los métodos que dependen de las propiedades biológicas se utilizan reactivos que unen el anticuerpo en forma de complejo pero no en forma libre, ya sea a través de la porción Fc del anticuerpo o de algunos componentes del complemento. Los reactivos más usados son: Clq, factor reumatoide (anti-inmunoglobulina), anticuerpos anti-inmunoglobulinas de baja afinidad y conglutinina. Otros métodos utilizan células: plaquetas, granulocitos, macrófagos, eritrocitos, linfocitos B, linfocitos K y células linfoides (células Raji) (193), (ver tabla V).

Como cada técnica detecta inmunocomplejos con diferentes propiedades fisicoquímicas y biológicas es importante utilizar más de una técnica cuando se sospecha que puedan tener un papel patogénico. Es necesario además correlacionar la presencia, tamaño y composición de los ICs con los datos clínicos, histológicos y analíticos de los pacientes.

Nosotros hemos utilizado varias técnicas para detectar ICs de IgA: en la primera, mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa a pH 7,4 y pH 2,8 y RIA de IgA en cada una de las fracciones (ver 3.3.1. y 3.3.2.) es posible separar físicamente los ICs de las Igs libres. La segunda técnica se basa en la propiedad de las células Raji de tener receptores para los factores C3, Cab, Cad y C12 del complemento. Los ICs circulantes de IgA o IgG que hayan activado el complemento por la vía clásica o alterna podrán ser detectados por esta técnica (3.4.1.). La tercera, se basa en distinguir los ICs de IgA por su capacidad de inhibir la unión de un antisuero de conejo anti-IgA humana de baja afinidad a una IgA-Sepharosa. Esta unión es independiente de la capacidad del IC para activar el complemento (3.4.2.). La cuarta se basa en una modificación introducida por nosotros en el método de las células Raji para detectar ICs de Ig polimérica (3.4.3.). Por último, hemos detectado anticuerpos específicos contra algunos antígenos de origen alimenticio, como albúmina sérica bovina y albúmina de huevo presente en los IC formados tras una dieta hiperproteica (3.4.4.).

#### 3.4.1. Método de las células Raji.

Se basó en el método de Theofilopoulos (194) modificado por nosotros para detectar ICs de IgA.

Se diluyeron los sueros 1/4 con Tris Tyrode completo, con BSA 0,5% y glucosa 0,1%. Se incubaron 30  $\mu$ l. del suero diluido con  $2 \cdot 10^6$  células (en 50  $\mu$ l.) durante 45 min a 37°C. Después de las células tres veces con el mismo tampón centrifugando a 1000 rpm, 10 min, se incubaron con, 20  $\mu$ g de anti-IgG o anti IgA marcados con  $^{125}$ I (ver marcaje 3.4.1.) durante 30 min. a 4°C. Después se lavaron las células, en un contador gamma. Los resultados se expresaron según 3.4.5.

Los antisueros utilizados eran comerciales (Behring, Alemania) y previamente habían sido precipitados con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 50% pH 7,4 para obtener la fracción  $\gamma$ -globulina. La concentración de antisuero utilizada determinó de la siguiente forma: se prepararon agregados de IgG o de una mezcla de IgA e IgG calentándolos de 15 a 70 min. a 63°C (ver sec. 3.6.1.). Después se incubó una cantidad determinada de agregados con suero humano normal fresco durante 30 min. a 37°C con el fin de activar el complemento. Una vez transcurrido ese tiempo se añadieron  $2 \cdot 10^6$  células a cantidades diferentes de agregados en un volumen final de 80–100  $\mu$ l. Se incubaron durante 45 min. a 37°C, se lavaron las células y se volvieron a incuban con diferentes cantidades de los antisueros respectivos marcados con  $^{125}$ I durante 30 min. a 4°C. Una vez lavadas las células y medida su radioactividad en un



Tabla V. METODOS PARA DETECTAR INMUNOCOMPLEJOS

---

1.- Técnicas físico-químicas:

- Ultracentrifugación analítica.
- Centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa.
- Filtración en gel.
- Ultrafiltración.
- Electroforesis.
- Precipitación con polietilen-glicol ( PEG ).
- Crioprecipitación

2.- Métodos basados en las características biológicas de los ICs:

a) Técnicas con el complemento:

- Prueba del consumo del complemento.
- Métodos basados en la interacción de los ICs con C1q purificado.
- Análisis de productos derivados de la rotura de C3 ó C1.
- Prueba de la precipitación del C3.
- Radioinmunoanálisis de la conglutina.

b) Técnicas con antiglobulinas:

- Pruebas con factores reumatoídes.
- Otras antiglobulinas.

c) Técnicas celulares:

- Agregación de plaquetas.
- Inhibición de la citotoxicidad dependiente del anticuerpo.
- Inclusiones intracitoplasmáticas en polimorfonucleares neutrófilos.
- Liberación de enzimas de eosinófilos y mastocitos.
- Inhibición de la fagocitosis de macrófagos.
- Inhibición de la formación de rosetas.
- Unión a las células Raji.
- Id. células de la leucemia de ratón L1210.
- Id. con eritrocitos humanos.

d) Otros métodos:

- Unión a la proteína A del *Staphylococcus aureus*.

contador y se determinaba el máximo tanto por ciento de unión del antisuero. Posteriormente en todas las pruebas se utilizó la misma concentración y el mismo lote de antisuero.

#### 3.4.2. Método de la inhibición de la unión de una anti-IgA humana.

Se basó en el método de Kauffman (100). Primero se preparó un anticuerpo anti-IgA humana policlonal de baja afinidad por la IgA monomérica pero con una gran afinidad por IgA agregada o en forma de ICs. Para ello 10 mg de IgA policlonal con adyuvante de Freund, se inyectó intradérmicamente a un conejo. Después de cuatro días, se empezó a medir la actividad de anticuerpo del suero del conejo por su capacidad de aglutinar eritrocitos de cordero recubiertos de IgA (111). El día de máximo título aglutinante los conejos se sangraron y el antisuero se adsorbió con suero de cordón umbilical humano unido a un Biogel P-300 por el método de Avrameas (192).

El pico obtenido (después de concentrar mediante presión negativa) se pasó por una columna de Ultrogel AcA 22 equilibrada con PBS. La fracción IgM (1<sup>er</sup> pico) se recogió y una vez concentrada se adsorbió con IgA unida a una Sepharosa 4B (ver 3.2.4.a.) y se eluyó con KSCN 1 M pH 7,0. El eluido se dializó frente a PBS, se concentró y se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  en alícuotas.

##### 3.4.2.a. Marcaje.

La IgM de conejo anti-IgA humana se marcó con  $^{125}\text{I}$  por el método de la cloramina T (ver 3.4.1.), con una actividad específica de 0.2 – 0.4 mCi/mg.

##### 3.4.2.b. IgA Sepharosa 4B.

Una IgA monoclonal se unió covalentemente a la Sepharosa 4B activada con BrCN por el método de Cuatrecasas (ver 3.2.4.a) a una concentración de 0,015 mg IgA/mg de Sepharosa 4B (peso seco). El inmunoadsorbente se guardó a  $4^{\circ}\text{C}$  en PBS con EDTA 2mM.

##### 3.4.2.c. Técnica de la inhibición de la unión de la anti-IgA (Inh-anti IgA).

Consta de dos pasos. En el primero se añadieron a los tubos 200  $\mu\text{l}$  del tampón de unión (0,075M Tris-HCl, 0,01M EDTA, pH 7,4) conteniendo albúmina sérica bovina (BSA) al 1%, 50  $\mu\text{l}$  de suero diluido 1:10 en el tampón de unión y 50  $\mu\text{l}$  de  $^{125}\text{I}$ -IgM anti-IgA humana (0,09 – 0,3  $\mu\text{g/ml}$ ). La mezcla se incubó durante 2 h a  $4^{\circ}\text{C}$  con agitación continua. En el segundo paso, se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de IgA-Sepharosa diluidos en el tampón de unión a una concentración final de 10 g de Sepharosa / 100 ml y se incubó durante 16 h. a  $4^{\circ}\text{C}$  con agitación. Después se añadieron 200  $\mu\text{l}$  del tampón de lavado (NaCl 0,4M, EDTA 0,1M pH 7,4) y los tubos se centrifugaron a 270 x g durante 4 min. El sobrenadante se aspiró y la IgA-Sepharosa 4B se lavó tres veces con 800  $\mu\text{l}$  del tampón de lavado. Después de la última centrifugación la radioactividad del precipitado se midió en un contador gamma. Los resultados se expresaban según 3.4.5.

#### 3.4.3. Determinación de ICs de IgA polimérica.

Se trata de un método inédito, puesto a punto por nuestro laboratorio (176). Se procede de la misma forma que en el método descrito para detectar ICs por la unión a las células Raji (3.4.1.), sólo que en vez de incubarlo con un antisuero específico contra alguna de las inmunoglobulinas humanas, se incubaba con componente secretorio libre (SC) marcado con  $^{125}\text{I}$ . Dado que la IgM también tiene afinidad por el SC y para descartar falsos positivos, previamente se adsorbió la IgM de los sueros problema mediante un inmunoadsorbente de anti-IgM Sepharosa.

#### 3.4.3.a. Preparación del inmunoabsorbente anti-IgM Sepharosa 4B.

Se utilizó un antisuero comercial (Operon, Zaragoza, España) de conejo anticadenas  $\mu$  humanas. Se precipitó con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y después se dializó frente a tampón carbonato/bicarbonato 0,1M; NaCl 0,5M pH 8,5. El procedimiento de unión fue similar al descrito en 3.2.4.a.

#### 3.4.3.b. Adsorción de la IgM.

Una cantidad fija de anti-IgM-Sepharosa (10 mg Sepharosa/100  $\mu\text{l}$  = 100–150  $\mu\text{g}$  de anti-IgM/100  $\mu\text{l}$ ) se incubó con diluciones seriadas de un pool de 10 sueros humanos normales durante 2 horas a temperatura ambiente y con agitación constante. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó la mezcla a 200 g durante 10 min. Se recogió el sobrenadante y se vio si daba una banda de precipitación por inmunodifusión doble dimensional frente a un antisuero anti-IgM humana. Se comparó con los resultados obtenidos sometiendo a los sueros a las mismas manipulaciones con una cantidad similar de Sepharosa 4B sin antisuero. En los ensayos se utilizó siempre una dilución cuatro veces mayor a aquella en la que ya no se apreciaba una banda de precipitación. En las condiciones expuestas correspondía a una dilución 1/10 y una concentración media de IgM de 0,15 mg/ml medido por inmunodifusión radial.

#### 3.4.3.c. Marcaje.

La fracción  $\gamma$ -globulínica de un suero de conejo anti-IgA humana se marcó con  $^{125}\text{I}$  por el método de McConahey y Dixon (ver 3.1.4.a.) con una actividad específica de 0,3–0,5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  de proteína. El componente secretorio libre (SC) se marcó por el método de la lactoperoxidasa (ver 3.1.4.b.) con una actividad específica de 0,5–1  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ . Ambas proteínas marcadas se diluyeron en TBS-BSA 0,5% pH 7,4 y se guardaron a 4°C a la concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

#### 3.4.3.d. Sueros analizados.

Se analizaron sueros de individuos normales ( $n=24$ ), de pacientes con la enfermedad de Berger ( $n=10$ ) y cirrosis alcohólica ( $n=7$ ). Aliquotas de estos sueros se guardaron a  $-70^\circ\text{C}$  y solamente se descongelaron una vez. También se analizaron los sueros de 6 individuos normales y 7 pacientes con la enfermedad de Berger, antes y 2,4,6 y 24 h después de darles una dieta hiperproteica (ver 3.4.4.).

#### 3.4.3.e. Detección de los ICs de IgA polimérica.

Se incubaron 75  $\mu\text{l}$  de los sueros diluidos al 1/10 con Tris-Tyrode completo + BSA 0,5% y glucosa 0,1% pH 7,4 (adsorbida previamente la IgM) con  $2 \cdot 10^6$  células Raji (50  $\mu\text{l}$ ) durante 45 min. a 37°C. Transcurrido ese tiempo se lavaron las células tres veces con el mismo tampón, centrifugando cada vez a 200 g durante 10 min. Después se añadió 1  $\mu\text{g}$  de SC marcadas con  $^{125}\text{I}$  y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavaron de nuevo las células tres veces con el mismo tampón y se midieron en un contador  $\gamma$ .

Los ICs de IgA se detectaron según la técnica descrita en 3.4.1.. Los resultados se expresaron según 3.4.5.

#### 3.4.3.f. Determinación concentración de $^{125}\text{I}$ -SC empleada.

La concentración óptima de  $^{125}\text{I}$ -SC se calculó considerando que en el suero la IgA polimérica representa un 20–30% de la IgA total. Si toda la IgA polimérica estuviera como ICs en la dilu-

ción empleada (1/10) representaría 20–80  $\mu\text{g/ml}$  de ICs de IgAp en los individuos normales (rango establecido a partir de la media  $\pm$  2 desviaciones standard; ver tabla VII) y en los cirróticos alcohólicos habría como máximo 60  $\mu\text{g/ml}$  (media  $\pm$  2 desviaciones standard, tabla VI). Para obtener la máxima unión de  $^{125}\text{I}$ -SC con 60  $\mu\text{g}$  de IgA polimérica la relación molar óptima es (1:7,5) (20) y por tanto habría que incubarla con aproximadamente 17  $\mu\text{g}$  SC/ml.

#### 3.4.4. *Determinación de anticuerpos específicos en ICs circulantes. Su aplicación para ICs formados después de una dieta hiperproteica.*

Se realizó según el método de Paganelli y col. (155).

##### 3.4.4.a. *Sueros humanos.*

7 controles y 6 pacientes con la enfermedad de Berger se sometieron a una dieta hiperproteica (300 g de proteína). Se recogieron muestras de sangre antes y 2,4,6, y 24 h después de la comida. La sangre se coaguló a temperatura ambiente durante 1–2 horas, centrifugó y guardó a  $-70^\circ\text{C}$  en alícuotas hasta su análisis. Cada alícuota fue descongelada a temperatura ambiente y usada una sola vez.

##### 3.4.4.b. *Antígenos.*

La albúmina sérica bovina (BSA, fracción V) y la albúmina de huevo (OVA, grado V) se obtuvieron de Sigma Chemical Co.

##### 3.4.4.c. *Marcaje.*

Los antígenos se marcaron con  $^{125}\text{I}$  Na (Radiochemical, Centre, Amersham), según la técnica descrita en 3.1.4.a., con una actividad específica de 0,5–1  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  de proteína.

##### 3.4.4.d. *Aislamiento de los ICs de los sueros humanos.*

100  $\mu\text{l}$  de suero se mezclaron con 100  $\mu\text{l}$  de EDTA (0,2M pH 7,5) y 50  $\mu\text{l}$  de 17,5% PEG en tampón borato salino pH 8,0 (BBS) para dar una concentración final de PEG del 3,5% (37). Se incubaron durante toda la noche a  $4^\circ\text{C}$ . Después de centrifugar a 2400 x g 10 min, el precipitado se lavó una vez con PEG 3,5% y se redisolvió en tampón glicina-HCl 0,2M pH 2,6 al volumen original, para disociar los ICs precipitados.

##### 3.4.4.e. *Detección de los anticuerpos.*

50  $\mu\text{l}$  de la solución anterior se incubó durante 19 h a temperatura ambiente ( $22^\circ\text{C}$ ) en tubos de poliestireno para adsorber los componentes disociados a la superficie del plástico. Después se lavaron los tubos dos veces con PBS que contenía albúmina sérica humana al 0,2% (HSA) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con 100  $\mu\text{l}$  de este tampón para reducir la unión no específica en el siguiente paso. Después de dos lavados más, se añadieron 50  $\mu\text{l}$  del antígeno (BSA u OVA) marcado con  $^{125}\text{I}$ , y se incubó durante 18 h. a  $4^\circ\text{C}$ . Después de cuatro lavados con PBS-HSA, se midió la radioactividad unida a los tubos en un contador  $\gamma$ . El incremento neto de radioactividad fue calculado de la misma forma que en el resto de las técnicas de ICs (3.4.5).

#### 3.4.5. *Expresión de los resultados de las técnicas de ICs.*

El análisis estadístico fue realizado según el método de Hall (74). Muestras de sueros de 13

sujetos normales se probaron por duplicado en 9 días diferentes. Se escogieron cuatro sujetos con media representativa de los valores normales como controles de todos los experimentos. De esta forma, se obvió la variación día a día. Con la media de los controles en cada prueba, se estableció un

Límite de confianza del 95% :  $U_i = C_i + 2,2697 \sqrt{SE_c^2 + SE_p^2}$ .

La expresión que está debajo de la raíz cuadrada representa la suma de las variaciones de la media de los cuatro controles y de los sueros problema. 2,2697 es ese el punto más alto de la distribución t de Student para 8 grados de libertad y el 95% de confianza. La media de los duplicados de los sueros problema se dividió por  $U_i$ .  $T_i/U_i$  representa la relación fraccional del suero problema para el límite de confianza más alto de la población control. Si  $T_i/U_i$  está por encima de 1,0 el valor del suero problema sobrepasa el límite de confianza del 95% y se considera anormal.

### 3.5. Métodos utilizados en el estudio funcional de los polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) en los pacientes con la enfermedad de Berger y del papel de la IgA en la regulación de algunas funciones leucocitarias.

#### 3.5.1. Aislamiento de PMNs.

Se realizó por el método de Henson y col. (78) parcialmente modificado.

Se recogió sangre de pacientes o controles en tubos Falcon de polipropileno de 50 ml con 100  $\mu$ l de heparina/10 ml sangre. Se centrifugó a 550 x g durante 20 min a temperatura ambiente. La sangre se separó en tres capas. La superior estaba constituida por el plasma rico en plaquetas que se separó y guardó a  $-20^\circ\text{C}$ . La intermedia contenía el 90% de las células mononucleadas y se descartó. La inferior contenía los eritrocitos y polimorfonucleares (PMNs). Con el fin de separar los eritrocitos de los PMNs, se mezcló esta capa con gelatina al 2,5% y se dejó sedimentar a 1 x g, durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$ . El sobrenadante se resuspendió en Tris Tyrode pH 7,4 sin  $\text{Ca}^{++}$  ni  $\text{Mg}^{++}$  y centrifugado a 200 x g durante 10 min a temperatura ambiente. El precipitado de células se sometía a un choque hiposmótico (1 vol salino/3 vol  $\text{H}_2\text{O}$  destilada) durante 2 min para lisar los eritrocitos contaminantes. Se lavaron dos veces con Tris Tyrode pH 7,4 sin  $\text{Ca}^{++}$  ni  $\text{Mg}^{++}$  y finalmente se resuspendió a una concentración de  $2,5 \cdot 10^6$  cel/ml. La viabilidad de las células por el método de exclusión del Azul de Trypan al 2,5% fue alrededor del 92%.

#### 3.5.2. Función fagocitaria.

Se estimó por el método de Ward y col. (213) con ciertas modificaciones. Se incubaron los PMNs de pacientes y controles ( $1 \cdot 10^7$  células), con IgG agregada por el calor (1 mg/ml  $63^\circ$ , 30 min) y marcada con  $^{125}\text{I}$ , en 0,5 ml de Tris Tyrode pH 7,4 completo con BSA 0,25% pH 7,4 y glucosa al 0,1% durante 30 min. Se probó la reacción con EDTA 20mM pH 7,2 y se lavaron las células tres veces con Tris Tyrode sin  $\text{Ca}^{++}$  ni  $\text{Mg}^{++}$ , con BSA 0,25% pH 7,4 a 200 x g, 20 min. Las cpm asociadas al precipitado de células se midieron en un contador  $\gamma$  y la unión inespecífica de los agregados de IgG a las paredes de los tubos se midió incubando  $^{125}\text{I}$ -A-IgG sin PMNs. Para comprobar que los PMNs se habían fagocitado, se incubaron con un antisuero anti-IgG humana marcado con fluoresceína y se visualizaron en un microscopio de inmunofluorescencia.

#### 3.5.3. Estudios de la motilidad.

##### 3.5.3.a. Migración dirigida.

El ensayo para determinar la migración dirigida se realizó según una modificación de la técnica de Boyden (19), usando microcámaras de plástico equipadas con filtros Millipore con un poro de 3  $\mu\text{m}$ ,  $5 \cdot 10^6$  PMNs/ml y una incubación de tres horas. Se evaluó el "índice del movimiento diri-

gido" determinando el número de neutrófilos acumulados en 16 campos tomados al azar en el lado inferior del filtro. En algunos experimentos se utilizó el "índice del frente principal" descrito por Zygmund y Hirsch (221); en este caso el tiempo de incubación fue de 40 min y el índice fue considerado como la media de la distancia recorrida por las dos primeras células en 10 capas escogidas al azar dentro del filtro.

Las citotaxinas utilizadas fueron caseína desnaturalizada a la concentración de 5 mg/ml en TC 199 y suero pool activado por la vía clásica o alterna del complemento siguiendo la metodología de Gallin y col. (61).

### 3.5.3.b. Medida de la migración al azar.

Se utilizó el mismo procedimiento arriba descrito con la única diferencia de que se utilizaron filtros con un poro de 8  $\mu$ m y que en la cámara inferior se ponían solamente TCM199. Para obtener una migración adecuada se añadió a la suspensión celular albúmina sérica bovina al 0,2%.

### 3.5.3.c. Estudio de posibles inhibidores de la migración dirigida.

Se utilizó la técnica de Keller y col. (103). Brevemente 0,5 ml de una suspensión celular a la concentración de  $5 \cdot 10^6$  PMNs/ml se incubó con 0,2 ml del plasma problema durante 60 min a 37°C con agitación constante. Después las muestras se centrifugaron y suspendieron de nuevo en 0,5 ml de TCM199. Los estudios de la motilidad se realizaron como ya se ha descrito utilizando caseína como citotaxina. Se consideró que había inhibidores cuando la variación respecto al índice del movimiento dirigido de las mismas células incubadas con TCM199 era más alto que un 15%.

## 3.6. Manejo de la IgA por el sistema mononuclear fagocítico.

### 3.6.1. Preparación de agregados de un tamaño definido.

La IgG o IgA se marcaron previamente con  $^{125}$ I con una actividad específica de 0,1–0,2 mCi/mg por el método de la cloramina T (Mc Connahey y Dixon, ver la 3.1.4.1.), después se agregaron calentando la IgG o la IgA (10 mg/ml) a 63°C durante 20 y 150 min respectivamente. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min para eliminar los agregados insolubles. Para separar los agregados solubles de la proteína no agregada se pasaron por una columna de Ultrogel ACA 22 equilibrada con TBS pH 7,4 conteniendo BSA al 0,5% para prevenir la autoagregación (110). De esta forma se obtenían agregados solubles de  $1-2 \cdot 10^6$  D que guardaron en alícuotas  $-20^\circ\text{C}$ . Periódicamente se revisó el tamaño, homogeneidad y estabilidad de los agregados mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

### 3.6.2. Aclaramiento sanguíneo y localización tisular específica de los agregados de IgA e IgG.

Se inyectaron i.v. 5  $\mu$ g de  $^{125}$ I-A-IgG ó  $^{125}$ I-A-IgA en 0,4 ml de TBS-BSA (multimérica, polimérica o monomérica) a ratones ICR Swiss de 15–20 g, anestesiados ligeramente con éter. Se estudió el aclaramiento sanguíneo y la localización en los órganos de los agregados en lotes de tres animales por cada tiempo, matándolos por exanguinación a los 5, 10, 30, 60 min, 4 h y 24 h después de la inyección. La localización tisular específica se calculó después de restar las cpm correspondientes al volumen residual sanguíneo que queda en cada órgano (106). Para ello, 5 min antes de matar a los animales se inyectaron i.v. hematíes marcados con  $^{51}\text{Cr}$  (ver 3.6.3.). Los órganos (hígado, bazo, riñón y pulmones) se quitaron, pesaron y contaron para  $^{125}$ I y  $^{51}\text{Cr}$  en un contador  $\gamma$ , así como una muestra de sangre de un volumen conocido. La localización específica se calculó utilizando las siguientes fórmulas:



$$\text{Volumen total (VTS) de sangre (ml.)} = \frac{\text{cpm}^{51} \text{ Cr inyectadas}}{\text{cpm}^{51} \text{ Cr/ml. de sangre}}$$

$$\% \text{ de la dosis inyectada en sangre} = \frac{\text{VTS (ml.)} \times \text{cpm}^{125} \text{ I/ml. sangre}}{\text{cpm}^{125} \text{ I inyectadas}} \times 100$$

Las cpm de  $^{125}\text{I}$  en sangre y las cpm  $^{125}\text{I}$  inyectadas representan las cuentas precipitables en TCA (ácido tricloro acético) al 10%.

$$\mu\text{l. de sangre residual en cada \acute{o}rgano (VSR)} = \frac{\text{cpm}^{51} \text{ Cr por \acute{o}rgano total}}{\text{cpm}^{51} \text{ Cr} / \mu\text{l. sangre}}$$

$$\% \text{ de la dosis inyectada localizada espec\acute{f}icamente en el \acute{o}rgano} = \frac{\text{cpm}^{125} \text{ I por \acute{o}rgano total} - \mu\text{l. VSR} \times \text{cpm}^{125} \text{ I} / \mu\text{l. sangre} \times 100}{\text{cpm}^{125} \text{ I inyectadas}}$$

El aclaramiento sanguneo de las sustancias inyectadas i.v. se ajusta a una funci3n exponencial siendo la tasa de aclaramiento dependiente de la d3sis inicial, proporcional a la concentraci3n en sangre e inversamente proporcional a la cantidad ya fagocitada. Representando gráficamente el logaritmo del % de la d3sis en sangre frente al tiempo obtendremos una recta cuya pendiente K nos dar3 una idea de la tasa de aclaramiento. Para cada sustancia se obtiene la ecuaci3n de una recta:

(1)  $Y = \log S = Kt + \log S_0$ ; donde S es el porcentaje de la sustancia en un tiempo determinado,  $S_0 = \text{id. para } t=0$  (ordenada en el origen), K es la pendiente de la recta y t es el tiempo.

En su forma exponencial:

(2)  $S = S_0 \cdot 10^{Kt}$ ; diferenciando respecto al tiempo obtendremos la velocidad de aclaramiento:  $V = dS/dt = 10^{Kt} (2,3026) K \cdot S_0$ . Para  $t=0$ ,

(3)  $V = dS/dt = 2,3026 K \cdot S_0$ . De esta forma la velocidad de aclaramiento se calcul3 para cada sustancia al  $t = 0$ .

De (1)

$$K = \frac{\log S - \log S_0}{t}, \text{ nos da la tasa de aclaramiento}$$

y de (3)

$$t \cdot 1/2 = \frac{0,693}{2,3026 K}, \text{ llamada vida media. Representa el tiempo al cual la mitad}$$

de la dosis inyectada ha sido aclarada de la circulaci3n.

El tamaño de los agregados o de los sueros obtenidos a diferentes tiempos se calcul3 por ultracentrifugaci3n en gradiente de sacarosa (5-40%) (ver 3.3.1.).

### 3.6.3. Marcaje de los hematíes con $^{51}\text{Cr}$ .

Se incubaron  $2 \cdot 10^9$  hematíes de rat3n lavados con PBS con  $20 \mu\text{Ci}$  de  $^{51}\text{Cr}$  durante 30 min. a  $37^\circ \text{C}$ . Despu3s las c3lulas se lavaron cuatro veces en PBS pH 7,4 y se resuspendieron a una concentraci3n final de  $5 \cdot 10^7$  c3l./ml. Se inyectaron alícuotas de 0,2-0,3 ml. a esta concentraci3n.

#### 3.6.4. Catabolismo de los agregados por cortes de hígado y riñón.

Según el método de Knutson y col (110). A los 8 min. de inyectar 5 µg. de agregados de  $^{125}\text{I}$ -IgA ó  $^{125}\text{I}$ -IgG a los ratones, se mataron por exanguinación, se prepararon cuatro cortes de hígado y cuatro de riñón de 1 mm. de espesor, se pesaron y homogeneizaron. Dos partes se guardaron a 4° C y las otras dos se incubaron a 37° C durante 4 h. Después de ello se calcularon las fracciones solubles y precipitables en ácido tricloroacético al 10% comparándolas con las de los cortes guardados a 4° C. La fracción soluble en TCA al 10% es un índice del catabolismo de los agregados.

#### 3.6.5. Unión y catabolismo de los agregados por macrófagos peritoneales "in vitro".

Se utilizó el método de Knutson y col (110). Se obtuvieron macrófagos peritoneales de ratones matados por dislocación cervical mediante tres lavados de la cavidad peritoneal con 3 ml. de TBS-BSA a 4° C. Las células se lavaron tres veces con el mismo tampón centrifugando a 200 x g. durante 10 min. Una vez contados en hematocitómetro se hicieron alícuotas de  $2.10^6$  células y se incubaron durante 2 h. a 37° C en tubos siliconizados con el fin de unir las células adherentes. Las células no adherentes se eliminaron lavando con TBS-BSA tras una vigorosa agitación. La diferencia entre el n° de células iniciales y el n° de células no adherentes nos dio el n° de células adherentes, que representó alrededor del 40-50% de las iniciales. Más del 90% de las células adherentes ingerían partículas de latex y eran esterasas positivas utilizando el alfa naftilbutirato como sustrato. Agregados de IgG ó IgA marcados con  $^{125}\text{I}$  (1,5 y 10 µg.) en 100 µl, se incubaron con los macrófagos adheridos durante 3 h. a 37° C con agitación continua. Las células se lavaron tres veces, centrifugando a 1.000 rpm. 10 min. con TBS-BSA a 4° C y el sobrenadante se separó en cpm TCA solubles (proteína catabolizada) y cpm TCA precipitables (proteína inalterada). Todos los tubos se midieron para  $^{125}\text{I}$  en un contador γ automático. Los experimentos se realizaron en presencia de suero fresco de ratón al 10%, suero inactivado calentando a 56° C durante 30 min. o solamente con tampón. Las cpm asociadas a las células fueron siempre corregidas quitando la unión no específica de las proteínas a los tubos sin las células. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como media ± desviación standard.

#### 3.6.6. Estudios de inhibición cruzada.

Se realizaron por el método de Finbloom y col (55) parcialmente modificado. Quince minutos antes de inyectar la dosis del trazador (5µg. de agregados marcados con  $^{125}\text{I}$ ), se inyectó i.v. una dosis del posible inhibidor, 600 veces mayor que la del trazador (3 mg. de A-IgG). Los animales se sacrificaron 15 min. más tarde. Cinco min. antes se inyectaron hemáties marcados con  $^{51}\text{Cr}$  para corregir las cpm correspondientes al volumen residual en cada órgano. Se midieron las cpm asociadas a los órganos y a la sangre como en 3.6.2. El porcentaje de inhibición respecto a los controles se calculó mediante la fórmula:

$$\frac{\text{unión esperada} - \text{unión observada}}{\text{unión esperada}} \times 100.$$

#### 3.6.7. Aislamiento de hepatocitos.

Se utilizó el método de Castaño y col (27). El hígado se perfundió a través de la vena porta con una solución libre de  $\text{Ca}^{++}$  (solución de Hanks) a 37° C durante 5-10 min. Después se perfundió con colagenasa al 0,05% en presencia de  $\text{Ca}^{++}$  (solución de Hanks con  $\text{Ca}^{++}$  5 mM) durante 10 min. Durante la perfusión el medio se aireó vigorosamente con una mezcla de 95% de  $\text{O}_2$  y 5% de



CO<sub>2</sub>. Para obtener una suspensión de células se agitó el hígado suavemente a 4° C con una solución de Hanks sin carbonato pero con Hepes 20 mM. Los hepaticos se separaron de los restos tisulares centrifugando y lavando varias veces con el mismo tampón. La viabilidad de las células se cuantificó por el método del azul de Trypan al 0,2%.

*3.6.8. Unión de agregados de IgA a hepatocitos aislados.*

Se incubaron 3.10<sup>5</sup> células obtenidas según 3.6.7 con 10 µg. de diferentes proteínas, marcadas con <sup>125</sup>I en un volumen final de 200 µl. de TBS con BSA al 2,5%, a temperatura ambiente durante 30 min. y con agitación continua. Se lavaron tres veces a 1.000 rpm., 10 min. y se midieron cpm asociados a las células en un contador gamma.

En experimentos seleccionados, se realizaron estudios de inhibición competitiva. Los hepatocitos se incubaron durante 30 min. con un exceso de proteína no marcada (10 a 100 veces la concentración del trazador) y 10 µg. de proteína marcada con <sup>125</sup>I. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la unión a los hepatocitos de la dosis marcada. La viabilidad de las células a lo largo de la experiencia, se midió por el método de exclusión del azul de Trypan al 0,2% y fue del 80-85%.

#### 4. RESULTADOS.

##### 4.1. Estudio de los pesos moleculares de la IgA sérica y depositada en el mesangio glomerular.

###### 4.1.1. Estudio de la IgA sérica en pacientes con cirrosis alcohólica.

Se determinó el peso molecular mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa 5-40% a 170.000 x g. durante 16 h. a 4° C. La posición de los marcadores del gradiente se describen en la fig. 12.

La concentración de IgA en las diferentes fracciones se determinó por radioinmunoanálisis. En la fig. 13, se observa la puesta a punto del método, valoración del primer anticuerpo (13a) y curva standard (13b).

La media de los valores absolutos de la IgA sérica de los pacientes y de los controles, con sus diferentes pesos moleculares, se muestra en la tabla VI. En los pacientes con cirrosis alcohólica había un incremento significativo de la concentración de IgA en las fracciones con coeficiente de sedimentación entre 9-13 S (8,94 veces por encima de los controles), donde se espera que se encuentre la IgA polimérica. Había también un incremento de IgA monomérica (fracciones 5-9 S) en relación a los controles.

Para ver si la IgA de pesos moleculares elevados estaba en forma de inmunocomplejos, las mismas muestras fueron analizadas por ultracentrifugación a pH 2,8. Como se puede ver en la tabla VII, había un importante disminución en los niveles de IgA comprendidos entre 9-13 S, 13-17 S y 17-21 S, y un incremento en las fracciones 5-9 S. Estos resultados son compatibles con la presencia de inmunocomplejos de IgA en el suero de estos pacientes. Además, la comparación de los valores absolutos de IgA 9-13 S después de la centrifugación a pH 2,8 comparada con los controles (Tabla VII), sugiere la presencia de altos niveles de IgA polimérica. Para determinar si los elevados niveles de IgA polimérica eran meramente un reflejo del aumento de IgA total observada, los resultados también se expresaron en porcentajes (Tabla VI). Como puede verse, sigue habiendo un aumento de IgA 9-13 S y una disminución de las fracciones 5-9 S, confirmando que el incremento de IgA polimérica es a su vez en concentraciones absolutas y relativas.

Para confirmar totalmente que la IgA de pesos moleculares elevados es realmente IgA polimérica es necesario saber si tiene afinidad por el componente secretorio libre. Para ello, se aisló éste según la técnica descrita en la sección 3.2.4. y esquematizada brevemente en la fig. 14, se marcó con <sup>125</sup>I por el método de la lactoperoxidasa (3.1.4.b.) para evitar desnaturalizaciones y se incubó con la IgA sérica total depleccionada de IgM (ver descripción en 3.3.4.). Como puede observarse, en la tabla VIII y en la fig. 15, había un incremento en la afinidad por el componente secretorio en estos pacientes, comparándolo con la unión obtenida con un pool de 10 sueros humanos normales. Estos datos sugieren que los pacientes con cirrosis alcohólica tienen niveles elevados de IgA polimérica que puede estar en parte en forma de inmunocomplejos.

###### 4.1.2. Estudios en riñones.

Para caracterizar la IgA depositada en el mesangio glomerular en estos pacientes, planeamos dos tipos de experiencias. La primera de ellas consistió en determinar el peso molecular de la IgA eluida de riñones de autopsia y la segunda se basó en estudiar la afinidad por el componente secretorio por inmunofluorescencia o por ultracentrifugación.

###### 4.1.2. a. Estudio de la IgA eluida de riñones de autopsia.

Se pudieron estudiar seis riñones que mostraban depósitos de IgA en el mesangio glomerular por inmunofluorescencia. La IgA se eluyó a pH ácido con relativa facilidad según la técnica descrita

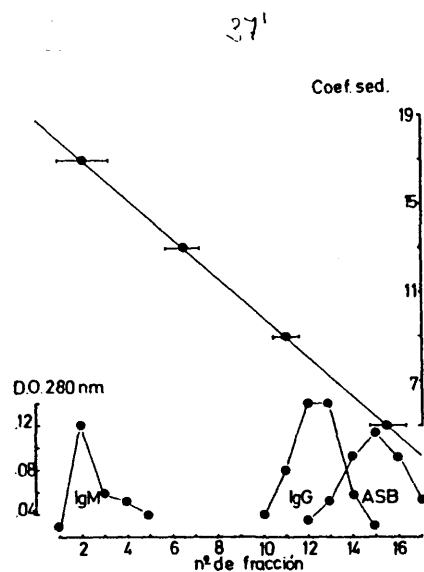


Fig. 12.— En la parte inferior de la figura se representa la posición de los marcadores después de una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (5–40%). En la parte superior están representados la posición media  $\pm$  desviación estándar de los coeficientes de sedimentación de 12 días diferentes obtenidos a partir de la posición de los marcadores, extrapolando a una recta por mínimos cuadrados.

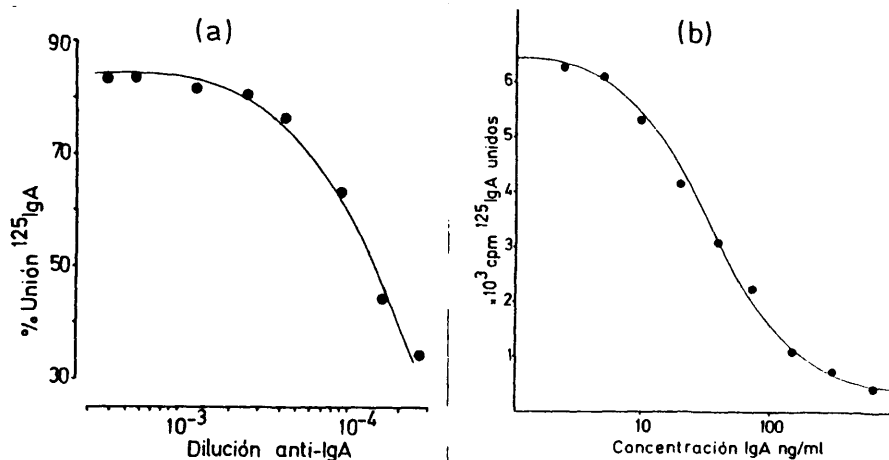


Fig. 13. (a). Valoración del primer anticuerpo del radioinmunoensayo. A una cantidad fija de  $^{125}\text{I-IgA}$  se añadían varias diluciones de un suero de conejo anti-IgA humana. La dilución del antisuero que unía el 50% de la  $^{125}\text{I-IgA}$  fue utilizada para la construcción de la curva standard. (b) Curva standard del radioinmunoensayo, 10–20 ng./ml. de  $^{125}\text{I-IgA}$  se incubó sola y añadiendo concentraciones conocidas de IgA sin marcar. Todos los tubos contenían la misma cantidad de  $^{125}\text{I-IgA}$  y de antisuero anti-IgA. El antisuero anti-IgA fue usado a la dilución que unía aproximadamente el 50% de la  $^{125}\text{I-IgA}$  en ausencia de IgA sin marcar (ver 13 a). La separación fue por el método del doble anticuerpo después de una incubación de 18 h. a  $4^\circ\text{C}$ .

TABLA VI. DISTRIBUCION DE LOS VALORES ABSOLUTOS Y PORCENTUALES DE LA IgA EN LOS SUEROS DE  
 PACIENTES CON CIRROSIS ALCOHOLICA DETERMINADOS POR ULTRACENTRIFUGACION.

	Sueros Normales ( n=10 )	Sueros Cirróticos ( n=6 ) <sup>(a)</sup>	▲▲ Valor de la p
5-9 S	( A ) 147,03 ± 56,3 ▲ ( B ) 72,1 ± 6,5	515,6 ± 196,3 65,07 ± 21,4	p < 0,0005 p < 0,0025
9-13 S	51,1 ± 31,0 23,1 ± 6,7	457,0 ± 435 33,2 ± 21,2	p < 0,01 p < 0,05
13-17 S	6,3 ± 2,7 3,0 ± 0,8	28,1 ± 14,8 1,5 ± 0,9	p < 0,0005 p < 0,0025
17-21 S	0,6 ± 0,5 0,5 ± 0,5	0,9 ± 0,9 0,1 ± 0,1	n.s. p < 0,05

▲ Media ± Desviación Standard.

▲▲ t-test no emparejado

( A ) = Valores absolutos expresados en mg % de la IgA detectada en cada zona.

( B ) = Valores porcentuales respecto a la IgA total.

n.s. = no significativo.

( a ) = Pacientes con cirrosis alcohólica y nefropatía de IgA.

Tabla VII. DISTRIBUCION DE LOS VALORES ABSOLUTOS DE LA IgA SERICA DESPUES DE UNA ULTRACENTRIFUGACION EN GRADIENTE DE SACAROSA EN PACIENTES CON CIRROSIS ALCOHOLICA Y EN CONTROLES.

	5-9S	9-13S	13-17S	17-21S
pH 7,4	558 $\pm$ 229 (a) p < 0,05 $\Delta$	620,7 $\pm$ 326,5 + p < 0,05	18,8 $\pm$ 13,8 p < 0,05	0,8 $\pm$ 0,9 n.s.
pH 2,8	1045,7 $\pm$ 374,9 (7,24) ++	172,4 $\pm$ 221,3 (3,28)	3 $\pm$ 1,7 (0,67)	0,09 $\pm$ 0,1 (0,12)
SHN (pH 2,8) $\Phi$	144,4 $\pm$ 16,9	52,5 $\pm$ 15,5	4,4 $\pm$ 1,7	0,7 $\pm$ 0,2

(a) Los resultados se expresan en mg% de IgA en cada zona.

+ = Media  $\pm$  Desviación standard de tres pacientes.

$\Delta$  = t-test emparejado; n.s. = no significativo; ++ Incremento de los valores medios de los pacientes en relación con los valores medios de los controles.  $\Phi$  = No se observaron cambios significativos en los sueros normales fraccionados a pH 7,4 y pH 2,8.

374

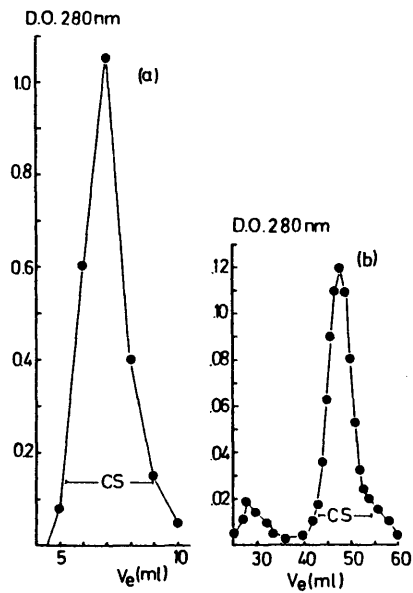


Fig. 14.— (a) Perfil de elución del componente secretorio de una columna de IgM-Sepharosa 4B equilibrada con ClNa 0,15 M, fosfatos 0,05 M pH 7,3 y eluida con SCNK 1 M, fosfatos 0,05 M pH 7,0. (b) Perfil de elución del componente secretorio obtenido en 14.a por una columna de Ultrogel AcA34 (2,6 x 40 cm.) equilibrada con ClNa 0,15 M, fosfatos 0,05 M pH 7,3.

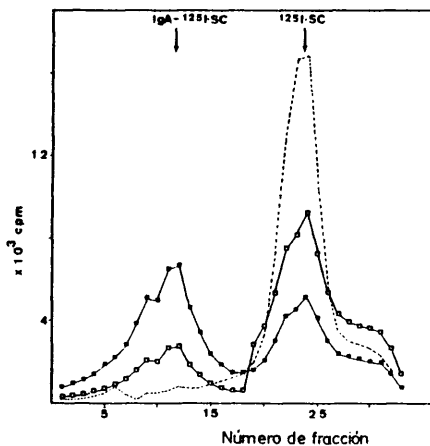


Fig. 15.— Distribución de la radioactividad después de una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (5-40%) a pH 7,4 de sueros de controles y de pacientes incubados con  $^{125}\text{I}$ -SC (componente secretorio). Ver material y métodos. Paciente 3 (■—■); Pool de sueros controles (□—□);  $^{125}\text{I}$ -SC libre (.....). El final del gradiente está a la izquierda. La posición de los marcadores fue la siguiente: IgM (fracción n° 3), IgG (fr. n° 18), BSA (fr. n° 21).

en 3.3.6. La recuperación de IgA fue de 6 a 68 mg./g. de corteza renal (media 24,56) (Tabla VIII). Para descartar que la IgA eluida de los riñones de autopsia fuera en realidad IgA sérica contaminante, se sometió a las mismas condiciones de elución el riñón de un cirrótico que por inmunofluorescencia no mostraba depósitos de IgA. Solamente se pudieron obtener trazas de IgA (ver tabla IX), por lo que se consideró que la IgA eluida en los otros pacientes era IgA mesangial. Mediante ultracentrifugación determinamos el peso molecular de esta IgA. Como puede observarse en la fig. 16, a pH fisiológico más del 50% de la IgA eluida tiene un peso molecular mayor que 9 S. Después del tratamiento a pH ácido, había una disminución significativa en las fracciones 9-13 S y un aumento de las fracciones 5-9 S. Estos resultados son compatibles con la presencia de IgA en forma de ICs. Para verificar que la IgA eluida con un peso molecular elevado tenía otras características de IgA polimérica, se estudió su afinidad por el componente secretorio. En los seis eluidos estudiados, el tanto por ciento de unión fue entre 17-32% (media  $22,84 \pm 7,09$ ), sugiriendo que, al menos una parte, era verdadera IgA polimérica.

#### 4.1.2.b. Estudios de la IgA renal por inmunofluorescencia.

En tres riñones de autopsia pudo estudiarse por inmunofluorescencia la afinidad de la IgA depositada por el componente secretorio (SC). Había una fijación positiva para el SC con un patrón granular similar al de la IgA (fig. 17). Tres pacientes con nefropatía lúpica y cinco con glomerulonefritis mesangiocapilar con depósitos de IgA y cuatro riñones normales no mostraron fijación por el SC. Cuatro pacientes con glomerulonefritis mesangial de IgM fueron utilizados como controles porque la IgM muestra afinidad por el SC in vitro (161) (Tabla IX bis). Estas experiencias confirman que la IgA depositada en el riñón de los pacientes con cirrosis alcohólica es, al menos en parte, IgA polimérica.

#### 4.1.3. Comparación de los pesos moleculares de la IgA sérica y eluida.

Como hemos visto, los aumentos de concentración de la IgA sérica en estos pacientes se observa tanto en la IgA polimérica como en la IgA monomérica. En un intento de saber si la IgA depositada en el mesangio es meramente un reflejo de la IgA sérica o si había predominio de la IgA polimérica, se compararon los porcentajes de IgA sérica y eluida en cada fracción. Los porcentajes de IgA 9-21 S en el suero de los seis pacientes estudiados en pH fisiológico representaban menos del 40% de la IgA total, frente a un 55% en las mismas fracciones de los riñones eluidos (Tabla VI y fig. 16). Estos datos parecen sugerir que la mayor parte de la IgA depositada era IgA de alto peso molecular. Los resultados de tres pacientes a los que se pudo estudiar simultáneamente el suero y la IgA eluida a pH 7,4 y pH 2,8 se representan en la fig. 18. Como puede observarse, a pH 2,8 había un incremento en IgA monomérica y una disminución de las fracciones 9-21 S en relación a lo obtenido a pH 7,4, siendo compatible con la presencia de IgA en forma de ICs en el suero y en los eluidos. Sin embargo, en cada paciente los porcentajes de IgA en las fracciones 9-21 S (donde se espera que esté la IgA polimérica) era más alto en el eluido que en el suero.

#### 4.1.4. Estudio de la IgA sérica en pacientes con el síndrome de Schönlein-Henoch.

La media de la IgA 9-13 S de siete pacientes estudiados estaba elevada respecto a los valores normales, pero las diferencias no eran significativas. Teniendo en cuenta que la mayor parte de la IgA dimerica y trimérica está en la fracción 9-13 S, se dividieron a los pacientes entre los que tenían porcentajes elevados de IgA en esa fracción y los que no lo tenían (Tabla X). La media de los porcentajes 9-13 S en el grupo de IgA elevada fue del  $39,34 \pm 8,87$  vs  $21,52 \pm 3,41$  ( $p < 0,005$ ) en los controles, representando alrededor del 43% de los pacientes.

En dos pacientes, se confirmó que las formas de IgA de elevado peso molecular tenían

Tabla VIII. AFINIDAD DE LA IgA POLIMERICA DEL SUERO POR EL COMPONENTE SECRETORIO. ‡

	% de unión del 125I-SC
Paciente nº 1	54,4
Paciente nº 2	47,1
Paciente nº 3	56,7
Paciente nº 4	47,5
Pool de 10 sueros controles	23

‡ Muestras de 100 µl de suero sin IgM ( diluidas 1/2 con PBS ) de pacientes y un pool de 10 sueros controles se incubaban con 125I-SC durante 2 horas a temperatura ambiente, se centrifugaban en un gradiente de sacarosa ( 5-40% ) y se determinaba el % de unión.



Tabla IX . Concentración de la IgA recuperada después de la elución a pH 2.8 de los riñones de pacientes con cirrosis alcohólica y depósitos de IgA en el mesangio glomerular.

	<u>g de corteza</u>	<u>ug IgA/g tejido</u>
Paciente 1	79	17,72
" 2	60	21,33
" 3	68	7,35
" 4	130	39,8
" 5	109	11,01
" 6	130	68,46
	<u>96 ± 31 †</u>	<u>28 ± 23</u>
A † † †	268	0,67 ( 2.4 % ) † †

† Media ± Desviación standard de seis eluidos

† † Porcentaje respecto al valor medio de la IgA recuperada en riñones con depósitos de IgA.

† † † Dos riñones sin depósitos de IgA apreciables por inmunofluorescencia.

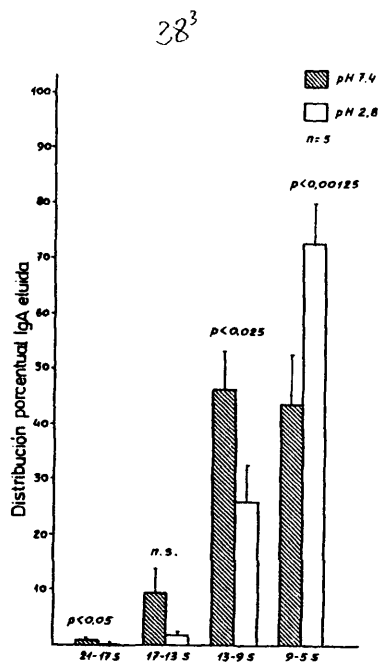


Fig. 16.— Distribución porcentual de la IgA eluida de los riñones cirróticos después de la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa a pH 7,4 y pH 2,8. Media  $\pm$  Desviación standard.

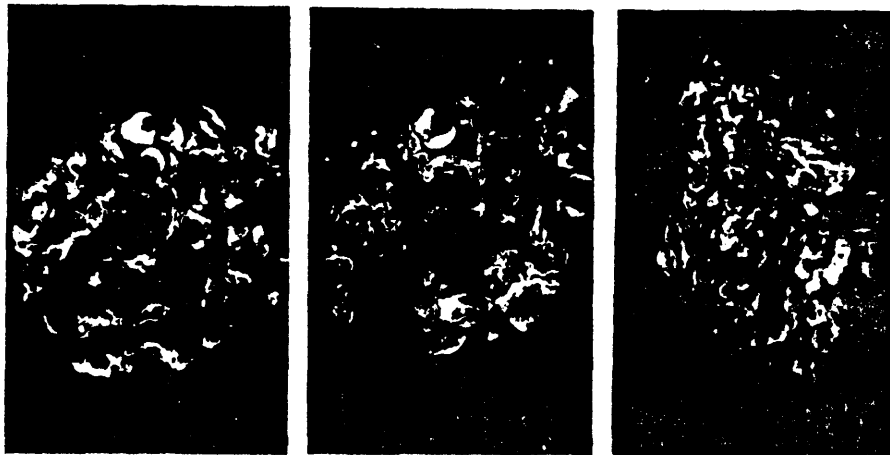


Fig. 17.— Microfotografías por inmunofluorescencia de cortes de riñón de pacientes con cirrosis alcohólica (izquierda y centro) y glomerulonefritis de IgM (derecha); Izquierda: Glomérulo teñido para IgA (anti-cadenas  $\alpha$ ); Centro: Glomérulo incubado con SC y teñido con un antisuero anti-SC; Id en la derecha como control positivo (Ver mat. y mét.).

TABLA IX bis. UNION DEL COMPONENTE SECRETORIO A LA IgA DEPOSITADA EN EL MESANGIO DE  
 PACIENTES CON DIFERENTES GLOMERULONEFRITIS.

	Nº de pacientes	Detección de IgA por IF +	Unión del SC + +	% de SC y IgA positivos.
Enfermedad de Berger	20	20	16	80
Síndrome de Schönlein-Henoch	7	7	6	85
Cirrosis alcohólica y nefropatía de IgA	3	3	3	100
Nefropatía lúpica membranosa	3	3	0	0
GN Mesangiocapilar	5	5	0	0
GN Mesangiocapilar	5	0	0	0
GN Mesangial de IgM	4	0	4	100 + + +
Riñones normales	4	0	0	0

3  
 85

+ IF= Inmunofluorescencia.

+ + Se incubaron los cortes renales con SC purificado ( 150 µg/ml ) en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se detectó el SC con un antisero anti-SC marcado con fluoresceína.

+ + + Este grupo se utilizó como control positivo porque solamente la IgM 19 S y la IgA polimérica tienen afinidad por el SC in vitro.

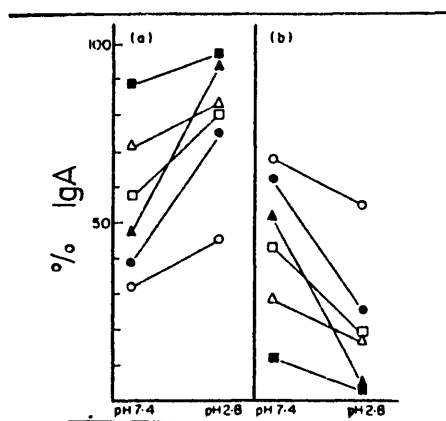


Fig. 18.— Comparación de los porcentajes de IgA, establecidos por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, de los sueros y eluidos de tres pacientes que se pudieron estudiar simultáneamente ( $\Delta$ ,  $\blacksquare$ ,  $\bullet$  = sueros;  $\triangle$ ,  $\square$ ,  $\circ$  = eluidos; cada símbolo representa un paciente diferente). Como puede observarse, a pH 2,8 había un incremento en los porcentajes de las fracciones entre 5 - 9 S y una disminución de las fracciones 9-21 S en comparación a lo obtenido a pH 7,4. Esto es compatible con la presencia de inmunocomplejos de IgA tanto en el suero como en los eluidos. Es importante destacar que los porcentajes de IgA 9-21 S (dónde se espera que esté la IgA polimérica) son más elevados en los eluidos que en los sueros.

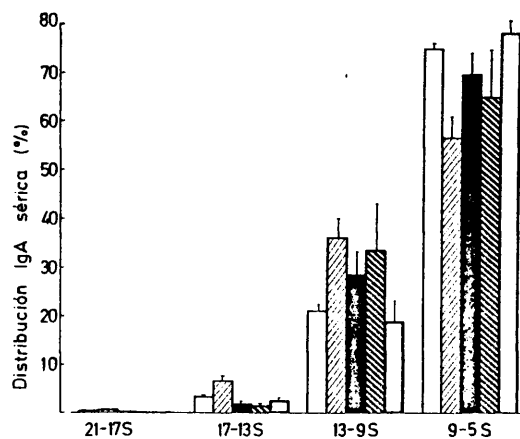


Fig. 19.— Distribución porcentual de la IgA sérica después de la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa a pH 7,4 de los sueros de controles ( $\square$ ), pacientes con la enfermedad de Berger ( $\text{hatched}$ ), Schönlein-Henoch ( $\blacksquare$ ), Cirrosis alcohólica ( $\text{dotted}$ ), otras glomerulonefritis ( $\text{dotted}$ ).

Tabla X . DISTRIBUCION DE LOS VALORES PORCENTUALES DE LA IgA EN LOS SUEROS DE PACIENTES CON EL SINDROME DE SCHONLEIN-HENOCCH Y EN CONTROLES, DESPUES DE UNA ULTRACENTRIFUGACION EN GRADIENTE DE SACAROSA ( 5-40% ) A pH 7,4.

	5-9S	9-13S	13-17S	17-21S
Pacientes con IgA polimérica elevada ( n = 3 )	59,63 ± 8,84▲	39,34 ± 8,87	1 ± 0,11	0 ± 0
	p < 0,0025▲▲	p < 0,0005	p < 0,0025	p < 0,0025
Pacientes con IgA polimérica normal ( n = 4 )	76,7 ± 9,22	20,29 ± 7,68	2,36 ± 1,37	0,47 ± 0,34
Controles ( n = 10 )	75,08 ± 3,17	21,12 ± 3,45	3,41 ± 0,95	0,37 ± 0,16

▲ Media ± Desviación standard.

▲▲ t-test no emparejado.

afinidad por el componente secretorio (resultados no mostrados).

#### 4.1.5. *Estudios por inmunofluorescencia en el síndrome de Schönlein-Henoch y en la enfermedad de Berger.*

Al igual que con las biopsias de pacientes con cirrosis alcohólica, en el síndrome de Schönlein-Henoch y en la enfermedad de Berger se encontró que la fijación del SC seguía el mismo patrón que la IgA sugiriendo la presencia de IgA polimérica. (Tabla IX bis).

#### 4.1.6. *Comparación de los pesos moleculares de la IgA sérica y de la IgA depositada en las tres enfermedades.*

Los resultados de esta tesis, junto a los ya representados referente a la enfermedad de Berger (120 y 121), indican claramente que las tres enfermedades comparten algunas de las anomalías observadas en la IgA sérica. Si representamos en histogramas los porcentajes de IgA en las diferentes fracciones obtenidas después de la ultracentrifugación, vemos (fig. 19) que la IgA 9-13 S está aumentada en las tres enfermedades. Sin embargo, mediante tratamiento ácido el comportamiento es distinto, ya que en la enfermedad de Berger apenas cambia el porcentaje de IgA en esa fracción, mientras que en la cirrosis alcohólica baja incluso por debajo de los controles. Sin embargo, expresando los resultados en valores absolutos, la IgA 9-13 S en los cirróticos está todavía 3,28 veces por encima de los controles a pH 2,8, mientras que en la enfermedad de Berger representa un aumento del doble respecto a los normales. No se pudo hacer una comparación con los valores absolutos de los pacientes con el síndrome de Schönlein-Henoch, debido a que varios de ellos eran niños que, como se sabe, tienen unos valores de IgA menores que los de adultos. En ninguna de las tres enfermedades había correlación entre el porcentaje de IgA 9-13 S y la concentración de IgA sérica total medida por inmunodifusión radial.

Los resultados obtenidos por inmunofluorescencia en las tres enfermedades también indican que la IgA depositada es en parte IgA polimérica. Hay que tener en cuenta que la IF es una técnica semicuantitativa y no permite establecer de una forma inequívoca si la IgA polimérica es predominante o no, pero el mayor porcentaje de IgA pesada (9-13 S) obtenida en los eluidos de los cirróticos (40% vs 55% pH 7,4), junto con la disminución de relación IgA monómero: IgA dimérico en el suero respecto de la IgA depositada (9:1 vs 3:1 a pH 2,8) sugiere un depósito selectivo de la IgA de alto peso molecular, ya sea en forma de ICs, como IgA polimérica o por una combinación de ambos.

#### 4.2. *Estudio de ICs en la enfermedad de Berger y en la nefropatía de IgA secundaria a una cirrosis alcohólica.*

##### 4.2.1. *ICs de IgA detectados por ultracentrifugación a pH 7,4 y 2,8.*

La no existencia hasta hace muy poco tiempo, de técnicas adecuadas para detectar ICs en los que la IgA formara parte, hizo pensar en un principio que los pacientes con la enfermedad de Berger no tenían ICs circulantes, aunque muchas características clínicas hacían suponer lo contrario. Al llevar a cabo el estudio precedente, observamos que al tratar los sueros a pH ácido, parte de la IgA que tenía un coeficiente de sedimentación mayor que 9 S desaparecía, disminuyendo los porcentajes de IgA en esa zona entre un 2 y un 50% ( $M = 17\%$ ). En cambio en los sueros normales la IgA mayor 9 S solamente disminuía entre un 0 y un 4,24% ( $M = 1,48\%$ ) (Tabla XI). Alrededor del 40% de los pacientes analizados tenían un incremento significativo de ICs de IgA de un tamaño intermedio (9-17 S) (que representaban alrededor del 90% de los ICs). Teniendo en cuenta que sólo se analizaron a pH ácido los pacientes que tenían un aumento significativo

Table XI. Porcentaje de la IgA sérica disociable a pH ácido en los pacientes con la enfermedad de Berger y en controles.

	9-13S	13-17S	17-21S	Total
Pacientes n=8	$10.78 \pm 2.69 //$	$5.47 \pm 0.76$	$0.46 \pm 0.13$	$16.85 \pm 6.7$
	n.s. #	$p < 0.05$	n.s.	$p < 0.05$
Controles n=5	$0.74 \pm 0.63$	$0.66 \pm 0.48$	$0.08 \pm 0.06$	$1.48 \pm 0.92$
// Media $\pm$ Desviación standard.				
# t-test no emparejado.				

de IgA 9-13 S (alrededor del 70 %), las cifras arriba apuntadas están algo sesgadas representando en realidad alrededor del 28% de la población total de pacientes con la enfermedad de Berger.

El porcentaje de pacientes con nefropatía de IgA secundaria a una cirrosis alcohólica que tenían ICs de IgA por esta técnica, era mayor que el de pacientes con la enfermedad de Berger (67% CA vs 28% Berger), siendo su tamaño más restringido (el 96% de los ICs en los CA tenían un tamaño 9-13 S mientras que en esa misma fracción los Berger tenían aproximadamente el 71% de los ICs (Tabla XII). Además, la proporción de IgA en forma de ICs disociables a pH 2,8 era sensiblemente mayor (42% CA vs 17% Berger).

#### 4.2.2. ICs de IgA ó IgG por la técnica de las células Raji o por la inhibición de la anti IgA (Inh-anti IgA).

Se escogieron cuatro controles con medias representativas que reflejaban el rango de todos los controles y se utilizaron en todas las pruebas. La unión obtenida con estos sueros expresado en cpm fue utilizada para determinar el límite superior de confianza diario de la población normal ( $U_i$ ).

Se estudiaron sesenta y tres pacientes a lo largo de cuatro años y aproximadamente el 31% tenían ICs de IgA por el método de las células Raji, mientras que por el método de la Inh-anti IgA sin precipitar con PEG, había un 36% de pacientes con ICs de IgA. Precipitando con PEG 3,5% bajaba hasta un 11% (fig. 20). Sorprendentemente el porcentaje de pacientes con ICs de IgG era mayor (55%) que el de IgA por cualquiera de las técnicas utilizadas. Aunque por el momento no sabemos el significado de este hallazgo, el 70% de los pacientes tenían un aumento de IgA polimérica y, como es sabido, ésta inhibe la quimiotaxis de polimorfonucleares neutrófilos (209). Es posible que el aclaramiento de los ICs de IgG está impedido, al menos temporalmente, y en este sentido, veremos más adelante que el plasma de estos pacientes inhibe la quimiotaxis de PMNs posiblemente asociado a la IgA polimérica (ver 4.3.2.).

No había correlación entre la existencia de ICs de IgG Raji y la actividad de la nefritis expresada por la aparición de microhematuria. Tampoco con los ICs de IgA detectados por el método de Inh-anti IgA. Sin embargo, sí la había con los ICs de IgA detectados por las células Raji (Tabla XIII). Levinsky y Barrat (119) habían sugerido que los ICs de IgG son los realmente nefritogénicos en niños con el síndrome de Schönlein-Henoch, pero en nuestro caso parece ser que se correlacionan mejor con una función renal conservada y menor proteinuria (Tabla XIV).

En los 21 pacientes que se estudió la IgA polimérica por ultracentrifugación, la proporción de ICs circulantes no difería de los resultados globales (ICs IgG Raji: 53%, IgA Raji: 43%, Inh-anti IgA sin PEG: 43%, Inh-anti con PEG: 17%) siendo por tanto una muestra representativa de la población total. Al tratar de correlacionar la presencia de ICs con la IgA polimérica observamos que el 60% de los pacientes que tenían un aumento de la IgA polimérica también tenían ICs de IgA Raji ( $p < 0,05$  Wilcoxon Test), (Fig. 21), mientras que no había diferencias significativas con los ICs de IgA detectados por las otras técnicas (incluida la ultracentrifugación a pH 2,8) ni con los ICs de IgG (fig. 21). Así mismo, tampoco pudimos encontrar correlación entre los niveles séricos de IgA (medidos por inmunodifusión radial) y los ICs de IgG ó IgA. El depósito de IgG en el glomérulo fue más frecuente en aquellos pacientes con ICs de IgG aunque no de forma significativa.

#### 4.2.3. Efecto de la difenilhidantoína (DFH) sobre los ICs.

Mediante estudios seriados comprobamos que los ICs se presentaban a menudo de forma intermitente, correlacionándose los ICs IgA Raji con la presencia de microhematuria. Los pacientes tratados con DFH (300 mg./día) fueron seguidos durante un año en su evolución clínica, histológica y analítica. Los ICs de IgG Raji no variaron significativamente a lo largo del tratamiento, así como los de IgA por las dos técnicas de Inh-anti IgA. En cambio los ICs IgA Raji disminuyeron



40'

Tabla XI: PORCENTAJE DE LA IgA SERICA DISOCIABLE A pH 2.8 EN PACIENTES CON CIRROSIS ALCOHOLICA.

	9-13 S	13-17 S	17-21 S	Total	IgA total en mg%
Pacientes (n=3)	40,77 ± 4,53 ▲	1,51 ± 0,07	0,05 ± 0,05	42,36 ± 6,61	1198 ± 536
Controles (n=5)	0,74 ± 0,63 ▲ p < 0.0125 ▲	0,66 ± 0,48 n.s.	0,08 ± 0,06 n.s.	1,48 ± 0,92 p < 0.0125	235 ± 29
▲ Media ± Error standard de la media					
▲ ▲ t-test no emparejado					

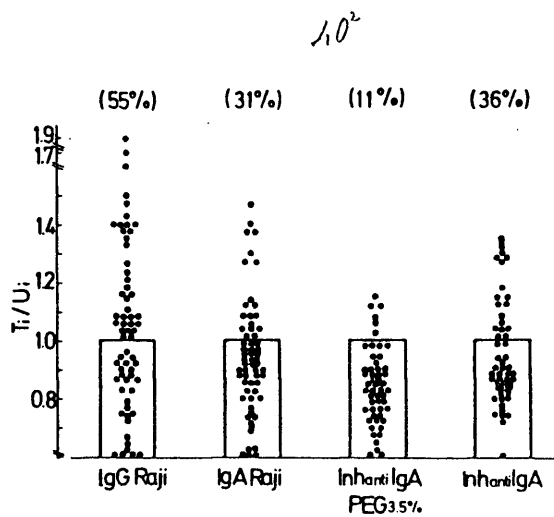


Fig. 20.— Porcentaje de pacientes con la enfermedad de Berger con ICs circulantes.  $U_i$  es el límite superior de confianza para la población normal (ver mat. y mét.). Los valores de  $T_i/U_i > 1$  son considerados anormales.

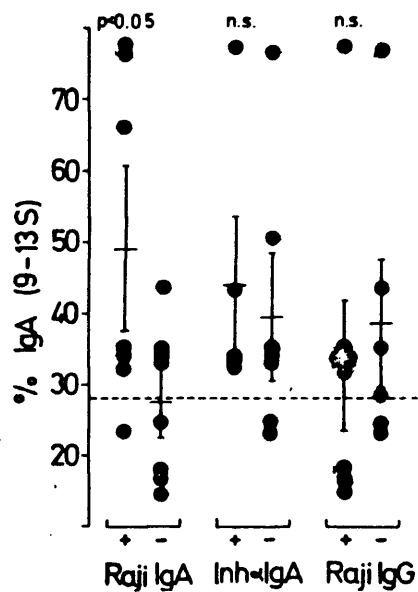


Fig. 21.— Correlación entre el % de IgA sérica polimérica (9-13 S) determinado por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa y la presencia de ICs de diferentes tipos en los pacientes con la enfermedad de Berger. La significación estadística fue analizada por el Test de Wilcoxon.

Tabla XIII. CORRELACION ENTRE ICs Y MICROHEMATURIA

Técnica	Pacientes con hematuria $< 4 \cdot 10^6$	Pacientes con hematuria $> 4 \cdot 10^6$	$\chi^2$	p
ICs -IgG (Raji)	12/20 (60 %)	23/43 (53 %)	0,23	ns
ICs -IgA (Raji)	3/20 (15 %)	17/43 (39 %)	3,7	$< 0.05$
ICs -IgA ( $\alpha$ -IgA con PEG)	1/13 (7 %)	5/39 (12 %)	0,25	ns
ICs -IgA ( $\alpha$ -IgA sin PEG)	3/13 (23 %)	15/39 (38 %)	1,01	ns

10<sup>3</sup>

Número de pacientes estudiados : 54

Número sueros estudiados :

	Hematuria $< 4 \cdot 10^6$	Hematuria $> 4 \cdot 10^6$	TOTAL
Raji (IgG e IgA)	20	43	63
$\alpha$ -IgA (con y sin PEG)	13	39	52

Tabla XV. GLOMERULONEFRITIS MESANGIAL IgA. CORRELACION ESTADISTICA ENTRE ICs E INSUFICIENCIA RENAL CRONICA.

Técnica	Pacientes con Crs < 1.5 mg/dl	Id. con Crs > 1.5 mg/dl	X <sup>2</sup>	p
ICs-IgG (Raji)	29/47 (61 %)	6/16 (37 %)	2,83	< 0.05
ICs-IgA (Raji)	14/47 (29 %)	5/16 (31 %)	0,01	ns
ICs-IgA (α IgA con PEG)	4/36 (11 %)	2/16 (12 %)	0,02	ns
ICs-IgA (α IgA sin PEG)	14/36 (38 %)	5/16 (31 %)	1,06	ns

10<sup>4</sup>

Número de pacientes estudiados : 54			
Número de sueros estudiados	Crs < 1.5 mg/dl	Crs > 1.5 mg/dl	TOTAL
Raji (IgG e IgA)	47	16	63
α IgA (con y sin PEG)	36	16	52

Tabla XIV.2. GLOMERULONEFRITIS MESANGIAL IgA. CORRELACION ESTADISTICA ENTRE ICs Y PROTEINURIA

Técnica	Pacientes (%) con proteinuria < 3 gr/día	Pacientes (%) con proteinuria > 3 gr/día	$\chi^2$	P
ICs-IgG (Raji)	29/42 (69 %)	7/21 (33 %)	7,2	<0,005
ICs-IgA (Raji)	12/42 (28 %)	7/21 (33 %)	0,07	ns
ICs-IgA (α IgA con PEG)	4/33 (12 %)	2/19 (10 %)	1,01	ns
ICs-IgA (α IgA sin PEG)	10/33 (30 %)	8/19 (42 %)	0,55	ns

40<sup>s</sup>

Número de pacientes estudiados : 54

Número de sueros estudiados

	Proteinuria < 3 gr/día	Proteinuria > 3 gr/día	Total
Raji (IgG e IgA)	42	21	63
αIgA (con y sin PEG)	33	19	52

significativamente a los seis meses, siguiendo disminuidos a lo largo de todo el tratamiento. (fig. 22). Concomitantemente la hematuria y proteinuria disminuyeron, siendo la primera de ellas estadísticamente significativa. El hecho de que haya una buena correlación entre la presencia de ICs de IgA Raji y la IgA polimérica elevada, así como la disminución de ambos por el tratamiento, correlacionándose a su vez con la hematuria, parece indicar que de todos los ICs de IgA detectados por las técnicas utilizadas, los ICs IgA Raji podrían servir como indicadores de la enfermedad.

#### 4.2.4. Comparación de los ICs de IgA detectados por las cuatro técnicas.

Un 40% de los pacientes con ICs de IgA Raji tienen a su vez ICs disociables a pH 2,8 medidos por ultracentrifugación y aproximadamente más de la mitad (67%) de los que tienen ICs detectables a pH 2,8, también tienen ICs que han activado el complemento (Tabla XIV bis). El hecho de que el 60% de los pacientes con ICs detectados por las células Raji no parezcan tener ICs disociables a pH 2,8 parece indicar que son ICs de gran afinidad por el antígeno y por tanto poco disociables. Así mismo, al estudiar el tamaño de los ICs detectados por las células Raji, observamos que la mayoría de ellos tenían un coeficiente de sedimentación muy pequeño (7-13 S) (Fig. 23) y por tanto no podíamos descartar que parte de la IgA que ha activado el complemento esté circulando sin unirse al antígeno, por un mecanismo parecido a lo que ocurre con los ICs insolubles *in vitro* (159). Estos por efecto del complemento son solubilizados parcialmente, detectándose por ultracentrifugación que en la fracción 7 S parte del anticuerpo está unido a factores del complemento sin la presencia del antígeno (159).

Es posible que en los pacientes con la nefropatía de IgA los ICs de IgA depositados en el mesangio activen el complemento liberando una parte de la IgA a la circulación. La mayor capacidad de la IgA polimérica para activar el complemento explicaría el tamaño de los ICs IgA Raji detectados por nosotros, ya que tienen un coeficiente de sedimentación parecido al de aquella (11 S). La poca disociación de la IgA sérica de estos pacientes a pH ácido, también iría a favor de la presencia en la circulación de una IgA polimérica no unida al antígeno.

Es posible que las técnicas empleadas detecten ICs de IgA con características inmunológicas y biológicas muy diferentes, no siendo fácil la comparación entre unas y otras. Así, solamente el 30% de los pacientes con ICs de IgA Raji tienen simultáneamente ICs detectados por la técnica de Inh-anti IgA sin PEG al 3,5% y viceversa, el 20% de los pacientes con ICs Inh-anti IgA tienen a su vez ICs de IgA Raji. (Tabla XIV bis). Aun más, al estudiar el tamaño de los tipos de ICs detectados simultáneamente en dos pacientes diferentes comprobamos que gran parte de los ICs detectados por una técnica no lo eran por la otra. Más del 80% de los ICs detectados por la Inh-anti IgA tenían un peso molecular  $> 700.000$  D en ambos pacientes mientras que los ICs de IgA Raji de ese tamaño eran solamente el 15-20% del total.

Al precipitar con PEG al 3,5% aumenta el número de pacientes que tienen simultáneamente ICs Inh-anti IgA y IgA Raji, aunque no al contrario (Tabla XIV bis). Como la precipitación con PEG al 3,5% selecciona los ICs de mayor tamaño, es posible que se produzca un enriquecimiento en ICs de gran peso molecular, entre los cuales una buena parte hayan activado el complemento. Sin embargo como los ICs Inh-anti IgA PEG 3,5% no tienen correlación alguna con los parámetros clínicos estudiados, no parecen ser los más adecuados para el seguimiento de la enfermedad.

Hay que tener también en cuenta que en las condiciones escogidas para precipitar con PEG 3,5% (90 min.) se seleccionan los ICs de mayor afinidad en detrimento de los de menor afinidad, sólo precipitables tras una incubación con PEG 3,5% de 18 a 24 horas (37). Es posible que de los ICs detectados por las células Raji sean precisamente los de mayor tamaño y afinidad los de menor importancia patogénica. Los de menor tamaño son difícilmente precipitables en las condiciones empleadas.

Aunque se han estudiado un número muy pequeño de sueros simultáneamente por la técnica de Inh-anti IgA y por ultracentrifugación a pH 2,8, son los que presentan una mejor co-

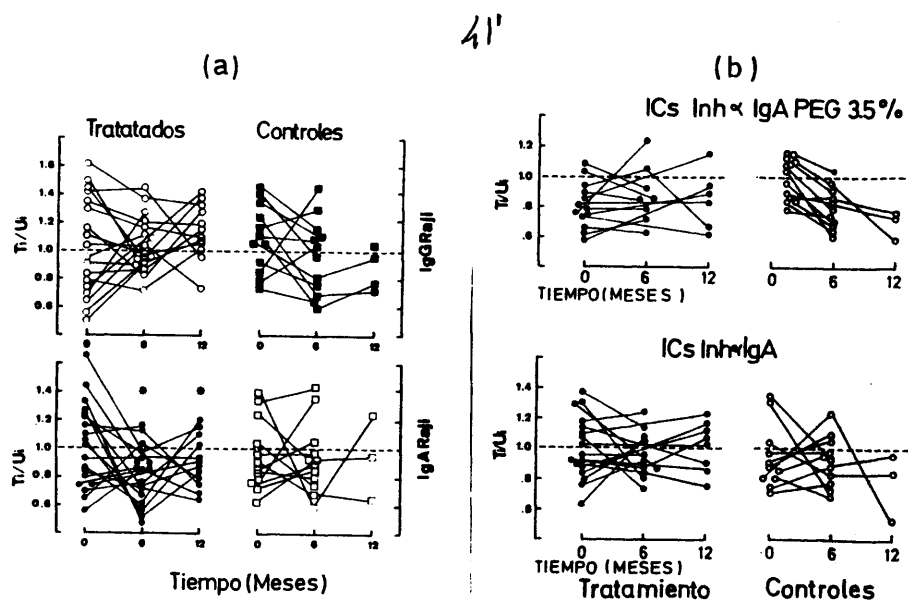


Fig. 22.— (a) Evolución de los ICs circulantes de IgG (parte superior de la figura) y de IgA (parte inferior) detectados por las células Raji en pacientes con la enfermedad de Berger a lo largo de 1 año de tratamiento con difenilhidantoína (izquierda de la figura) o sin tratamiento (derecha). + p 0,05 test de Wilcoxon. (b) Evolución de los ICs de IgA detectados por el test de inhibición de la anti-IgA de baja afinidad sin precipitar con PEG (parte inferior) ó precipitado con PEG al 3,5% (parte superior) en pacientes con la enfermedad de Berger en las mismas condiciones que en (a).

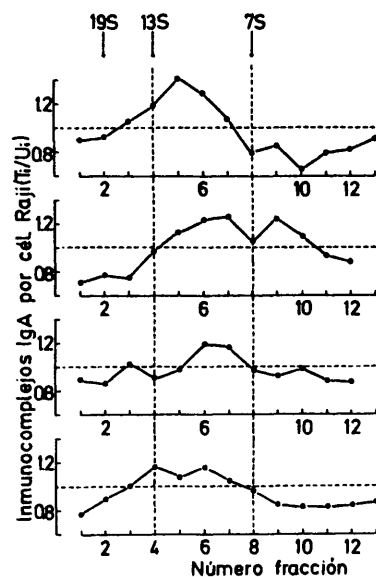


Fig. 23.— Tamaño de los ICs de IgA detectados por las células Raji en cuatro pacientes diferentes con la enfermedad de Berger. Se determinó mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (5–40%) a 170.000 g. durante 16 h. a 4°C.

Tabla XIV bis. CORRELACION ENTRE LAS DIFERENTES TECNICAS DE ICs DE IgA EN LOS PACIENTES CON LA ENFERMEDAD DE BERGER.

Técnica	Raji IgA	Inh-anti IgA	Inh-anti IgA + PEG 3,5 %	Ultracentrifugación a pH 7,4 y pH 2,8
Raji IgA	-	30 % ( n=65 )▲▲	20 % ( n=55 )	40 % ( n=6 )
Inh-anti IgA	21 % ( n= 65 )	-	3 % ( n = 53 )	67 % ( n=6 )
Inh-anti IgA + PEG 3,5 %	44 % ( n=55 )	7 % ( n= 53 )	-	NH
Ultracentrifugación a pH 7,4 y pH 2,8	67 % ( n= 6 )	100 % ( n=6 )	NH	-

▲ Porcentaje de pacientes que tienen ICs por las dos técnicas respecto al total de ICs positivos por una de ellas.

▲▲ El número entre parentesis representa los sueros estudiados simultáneamente.



relación entre sí (Tabla XIV bis). Todos los sueros con ICs detectados a pH 2,8 también tienen ICs por la Inh-anti IgA y viceversa la mayoría de los pacientes con ICs Inh-anti IgA también tienen ICs a pH 2,8. El hecho de que haya algunos pacientes positivos por la Inh-anti IgA y no por la ultracentrifugación a pH 2,8, parece indicar que también hay ICs de gran afinidad poco disociables a pH 2,8. Sin embargo al estudiar el tamaño de esos ICs no coincidían. El 90% de los ICs detectados a pH 2,8 tenían un tamaño 9-17 S mientras que los detectados con la técnica de Inh-anti IgA son mayores que 13 S.

En la nefropatía de IgA secundaria a una cirrosis alcohólica hay un porcentaje ligeramente mayor de pacientes con ICs de IgA Raji (43% CA vs 31% Berger) y Raji IgG (66,6% CA vs 55% Berger) mientras que el 100% de los pacientes estudiados tenían ICs Inh-anti IgA sin PEG, frente a un 36% en los Berger. Como dijimos al principio, en la cirrosis alcohólica hay una mayor proporción de pacientes con ICs pH 2,8 que los Berger (67% vs 28%) corroborando una vez más que, al igual que la Inh-anti IgA, son técnicas capaces de detectar una gran variedad de ICs de IgA aunque son poco discriminativas. Las células Raji al seleccionar ICs que hayan activado el complemento, independiente de su tamaño, parecen más adecuadas, dada la correlación con algunos parámetros clínicos, para el seguimiento de la enfermedad.

#### 4.2.5. ICs de IgA polimérica.

El papel específico desempeñado por la IgA polimérica tanto en procesos fisiológicos como patológicos planteaba la necesidad de disponer de una técnica que discriminara entre ICs de IgA monomérica o ICs de IgA polimérica.

##### 4.2.5.a. Controles.

Se utilizaron como controles negativos veinticuatro sueros humanos normales, en los que se midieron ICs IgA Raji y la afinidad de estos por el SC (ver 3.4.3.). Se estableció el rango de normalidad para ambas técnicas y cuatro sueros representativos se utilizaron para todas las pruebas (fig. 24). Como controles positivos se utilizaron dos sueros de pacientes cirróticos alcohólicos (EI y EM) en los que previamente se había detectado gran cantidad de ICs de IgA mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (pH 7,4 y pH 2,8) siendo una gran parte de ellos ICs IgA polimérica (ver 4.1.1.). Como puede verse en la tabla XV estos dos sueros también tenían ICs de IgA detectados por las células Raji. Cuando incubábamos las células Raji con estos sueros y con el  $^{125}$ I-SC hubo una unión significativamente mayor que la de los controles. Un tercer suero (A.R.) de un paciente con cirrosis alcohólica pero sin ICs de IgA también mostraba afinidad por el  $^{125}$ I-SC que se negativizaba al adsorber la IgM, presumiblemente porque se trataba de ICs de IgM, que como se sabe también tiene afinidad por el SC (20).

En tres sueros más, dos de ellos no tenían ni ICs de IgA ni eran SC positivos, mientras que el tercero sólo era positivo para Raji IgA, posiblemente porque se trataban de ICs de IgA monomérica.

##### 4.2.5.b. Unión a diferentes concentraciones de suero.

Determinamos la unión del SC a las células Raji incubando éstas con diversas concentraciones de un SHN o un suero IgA Raji positivo, antes y después de adsorber la IgM. Como puede observarse en la fig. 25a, conforme aumentábamos la concentración de SHN sin adsorber, también se incrementaba la unión del SC a las células Raji, pero siempre por debajo de la unión obtenida incubando con un suero IgA Raji positivo. Una vez adsorbida la IgM, la unión del SC a las células Raji incubadas con SHN se negativizaba, mientras que la unión a las células incubadas con el suero Raji IgA positivo permanecía prácticamente idéntica. Incubando una cantidad fija de suero con un nº creciente de células la unión era dosis-dependiente, alcanzándose una meseta que parece indicar que el sistema es saturable. (fig. 25b).

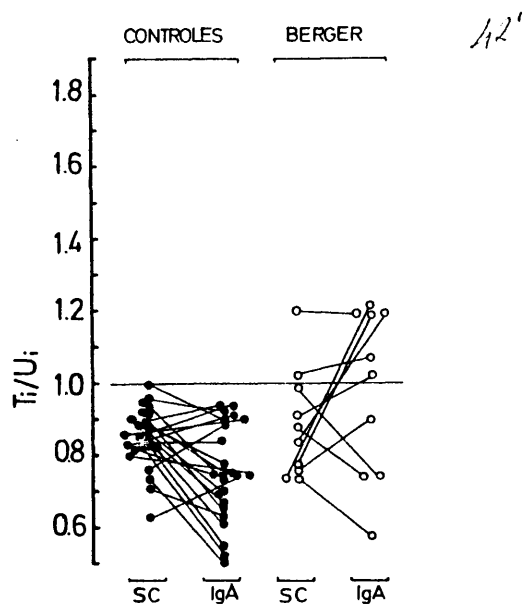


Fig. 24.— ICs de IgA con afinidad por el componente secretorio (SC) detectados en controles ( $n = 24$ , izquierda de la figura) y en pacientes con la enfermedad de Berger ( $n = 9$ , derecha) mediante las células Raji. Todos los sueros tenían la IgM adsorbida mediante un antisuero anti-IgM unido a una Sepharosa 4B. Solamente aquellos sueros que tenían ICs de IgA tenían afinidad por el SC ( $Ti/Ui > 1$ ).

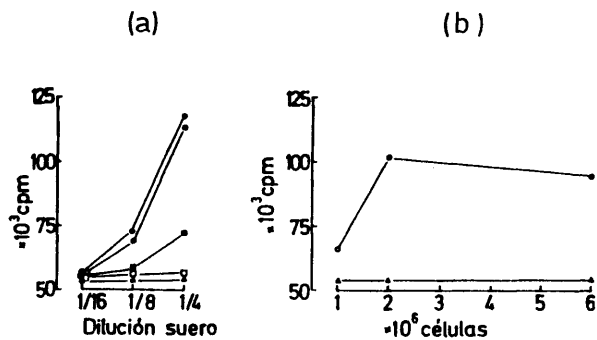


Fig. 25.— (a) Unión del componente secretorio ( $^{125}\text{I}$ -SC) a las células Raji después de incubarlas con Tris-Tyrosina completo ( $\blacktriangle$ ), con diferentes diluciones de un pool de sueros normales con IgM ( $\blacksquare$ ), con la IgM adsorbida ( $\square$ ), o bien con un suero de cirrótico alcohólico con ICs de IgA polimérica detectados por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, con IgM ( $\bullet$ ) o sin IgM ( $\circ$ ). (b) Unión del componente secretorio ( $^{125}\text{I}$ -SC) a un número creciente de células Raji incubadas previamente con una cantidad fija de un suero de cirrótico alcohólico con ICs de IgA polimérica (dilución 1/10) ( $\circ$ ) o con Tris-Tyrosina completo ( $\blacktriangle$ ).

Tabla XV. ICs DE IgA POLIMERICA EN PACIENTES CON CIRROSIS ALCOHOLICA.

Paciente	Ti/Ui <sup>‡</sup>		IgA 9-13S //
	Raji SC	Raji IgA	
E.J.	1,06	1,08	7,14
E.M.	1,54	1,01	4,19
A.R.	1,04/0,99 <sup>‡ ‡</sup>	0,86	0,03
M.T.	0,91	0,76	N.D.
R.M.	0,79	0,90	N.D.
S.G.	0,86	1,70	N.D.

<sup>‡</sup> Ti/Ui representa el cociente de dividir las cpm unidas a las células Raji en el suero problema por el límite superior de confianza de la unión obtenida con cuatro sueros normales.

<sup>‡ ‡</sup> Ti/Ui obtenido después de adsorber la IgM.

// Concentración en mg/ml de los ICs de IgA detectados por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa ( 5-40% ) a pH 7,4 y pH 2,8.

#### 4.2.5.c. *Detección de ICs de IgA<sub>p</sub> en enfermedad de Berger.*

Después de fijar las condiciones óptimas para realizar la prueba (ver 3.4.3. ) determinamos el porcentaje de pacientes con la enfermedad de Berger que tenían ICs de IgA polimérica. Como puede observarse (en fig. 24) dos de los seis sueros con ICs de IgA positivos, tenían también ICs de IgA polimérica (33%), siendo el porcentaje inferior al de los pacientes con nefropatía de IgA secundaria a la cirrosis alcohólica (66%). Es importante señalar la necesidad de adsorber la IgM, dada la posibilidad de que existan ICs con este isotipo. Inicialmente, el porcentaje de pacientes Raji SC positivos en la enfermedad de Berger se acercaba al 50%, pero solamente la mitad tenían simultáneamente ICs de IgA. Después de la adsorción de la IgM solamente los pacientes que tenían ICs de IgA seguían siendo positivos para el SC. Algunos pacientes que antes de adsorber la IgM eran Raji IgA y SC positivos se negativizaban para este último, indicando por tanto la presencia de ICs de IgA monomérica. Indirectamente se puede inferir que estos resultados de el 30% de los pacientes con la enfermedad de Berger tiene ICs de IgM.

#### 4.2.6. *Efecto de una dieta hiperproteica con los ICs circulantes.*

Por el momento no sabemos cuál es el significado de la presencia de ICs de IgA polimérica en estos pacientes, pero teóricamente son fácilmente eliminables y es posible que su presencia indique algún defecto en la eliminación a través de los hepatocitos. Para determinar esta posibilidad, un grupo de pacientes con la enfermedad de Berger fue sometido a una dieta hiperproteica (ver mat. y métodos, punto 3.4.3.).

Como es sabido, diversas macromoléculas son capaces de atravesar la barrera intestinal y actuar como antígenos. En los individuos normales se producen generalmente aunque no exclusivamente, anticuerpos del tipo IgA encargados de su eliminación (4).

##### 4.2.6.a. *Individuos normales.*

Después de la ingesta, en los individuos normales se producen ICs de IgA Raji (3/7) que son rápidamente eliminados de la circulación (entre las 2-6 h.) (fig. 26a inferior). En dos de ellos había un incremento en los niveles de ICs IgA Raji, aunque estaban todavía dentro de los valores normales establecidos para la prueba (Ti/Ui menor 1,0). En los controles con ICs IgA Raji positivos se observaba un perfil idéntico incubando las células Raji con <sup>125</sup>I-SC libre, lo que era compatible con la formación ICs de IgA polimérica (fig. 26a media). No se observó ningún aumento en los niveles de ICs de IgG Raji, mientras que los ICs de IgA, detectados por la prueba de Inh-anti IgA, aparecían tardíamente permaneciendo a las 24 h. 4 de ellos (67%) por encima de los valores normales (fig. 27).

##### 4.2.6.b. *Pacientes con nefropatía de IgA.*

En los seis pacientes el comportamiento tras la ingesta hiperproteica fue bien distinto. En aquellos pacientes que tenían previamente ICs IgA Raji (4/6) había una desaparición total o parcial de los mismos a las dos horas de la ingesta (fig. 26 b inferior). Posteriormente había un aumento a las 6 horas, permaneciendo dos de ellos por encima de los valores considerados normales a las 24 h. Solamente uno de ellos se correlacionaba con el perfil obtenido con los ICs Raji SC, por lo que presumiblemente la mayoría tenían previamente ICs de IgA monomérica. Dos de los pacientes permanecieron en todo momento dentro de los valores normales. La proporción de ICs IgA Inh-anti IgA a las 24 h. era menor que en los controles (33% vs 67%) (fig. 27).

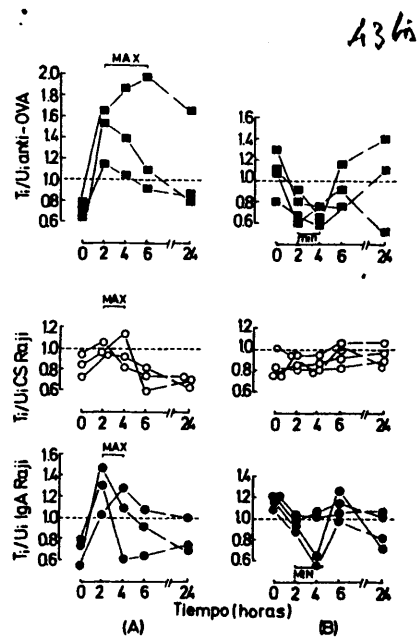


Fig. 26.— Evolución de los ICs circulantes después de una dieta hiperproteica en controles (A, izquierda de la figura) y en pacientes con la enfermedad de Berger (B, derecha). En la parte inferior de la figura se representan los ICs detectados por las células Raji; en la parte central los ICs con afinidad para el componente secretorio (SC) (ICs de IgA polimérica) y en la parte superior los anticuerpos anti-albúmina de huevo (OVA).

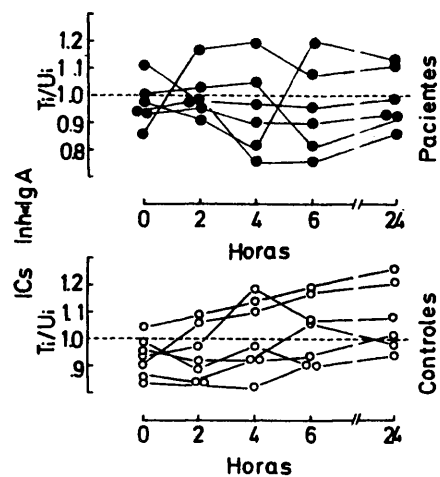


Fig. 27.— Evolución de los ICs de IgA (Inh anti-IgA) en controles (parte inferior de la figura) y en pacientes con la enfermedad de Berger (parte superior), después de una dieta hiperproteica.

#### 4.2.6.c. Presencia de anticuerpos específicos contra antígenos alimentarios.

Parece claro que una ingesta hiperproteica produce grandes cambios en los niveles de ICs de IgA, tanto en individuos normales como en pacientes. La bajada de ICs Raji IgA en estos últimos parece indicar que los antígenos alimentarios están implicados o al menos influyen en la composición de los ICs de IgA. Para tratar de confirmarlo intentamos correlacionar los niveles de ICs de una clase determinada (IgA o IgG) con la presencia de anticuerpos contra una serie de antígenos alimentarios (albúmina sérica bovina y ovoalbúmina) de pequeño peso molecular, capaces de atravesar la barrera intestinal. Sorprendentemente, en los controles los máximos niveles de anticuerpos anti-albúmina bovina (BSA) se alcanzaban justo antes o después del máximo de ICs de Raji IgA, no correlacionándose con ninguna técnica. Es posible que se traten de ICs de IgG no activadores del complemento o que estén formados por otra inmunoglobulina no detectable por las técnicas utilizadas. Solamente dos pacientes hacían anticuerpos anti-albúmina bovina permaneciendo el resto muy por debajo de los controles.

Con respecto a los anticuerpos anti-ovoalbúmina, (OVA), los tres controles que hacían ICs de IgA Raji, se correlacionaban estrechamente con los niveles de aquéllos. Había un máximo de anticuerpos anti-ovoalbúmina entre las dos y seis horas después de la ingesta, coincidiendo con el máximo de los ICs IgA Raji. (fig. 26 A superior). Posteriormente desaparecieron, permaneciendo solamente uno de ellos positivo a las 24 horas. En los cuatro pacientes que tenían inicialmente ICs IgA Raji tampoco producían anticuerpos anti-ovoalbúmina.

Teniendo en cuenta que previamente a la incubación con BSA u OVA marcadas con  $^{125}\text{I}$ , los sueros eran precipitados con PEG al 3,5%, y sometidos a pH ácido, los niveles de anticuerpos anti-BSA o anti-OVA corresponden realmente a los niveles de ICs circulantes en los cuales la BSA o la OVA son los antígenos. Por lo tanto, podríamos concluir que la formación de ICs, después de una ingesta hiperproteica, parece ser un mecanismo fisiológico normal encargado de la eliminación de antígenos de origen alimentario, y aunque se pueden formar ICs con inmunoglobulinas de diferentes tipos, la IgA polimérica pudiera tener un papel preponderante en la eliminación de estos antígenos.

La tendencia a persistir de los ICs de IgA Raji en los pacientes con la enfermedad de Berger, después de una caída inicial tras la ingesta, parece indicar un defecto del aclaramiento de los ICs activadores del complemento quizá provocado por una hiperproducción de los mismos (¿estimulación antigénica excesiva?), o bien el restablecimiento de un equilibrio con los ICs depositados después de la brusca disminución de los ICs circulantes.

### 4.3. Papel de la IgA polimérica sérica de los pacientes con la enfermedad de Berger en la modulación de algunas funciones leucocitarias.

#### 4.3.1. Efecto del plasma de los pacientes con la enfermedad de Berger sobre la migración de PMNs.

Teniendo en cuenta que habíamos demostrado previamente la existencia de elevados niveles

de IgA polimérica en el suero de los pacientes con la enfermedad de Berger (121), nuestro interés inicial fue el saber si el plasma de estos pacientes tenían un efecto inhibidor del movimiento de los PMNs, como ocurre en los pacientes con la enfermedad alcohólica hepática (208) o en pacientes con mieloma de IgA (209). Como puede observarse en la tabla XVI, el plasma de los pacientes con la nefropatía de IgA, tanto fresco como inactivado a 56°C durante 30 min, producía una disminución significativa de la migración dirigida de PMNs normales utilizando caseína como citotaxina. No se observaron diferencias entre los niveles séricos de las inmunoglobulinas y el efecto inhibidor. Las concentraciones séricas de C3, C4, y del proactivador del C3 fueron normales en todos los pacientes.

#### 4.3.2. *Efecto de la IgA polimérica y monomérica del plasma de pacientes con la enfermedad de Berger sobre la quimiotaxis de PMNs normales.*

Muestras de plasmas de tres pacientes y dos controles fueron fraccionadas mediante filtración en Ultrogel Aca22, equilibrado con PBS o por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (5-40%) y se separaron en tres fracciones formados por: fracción I: IgA que aparecía en el 1<sup>er</sup> pico de la columna de Ultrogel Aca22 (PM > 600.000 D); fracción II: IgA con IgG o inicio del 2<sup>o</sup> pico e inicio del 3<sup>o</sup> (fig. 28). Todas las fracciones eran concentradas por ultrafiltración hasta una concentración final de IgA o IgG de 5 mg/ml. Se adsorbía la IgM y después de una reducción y alquilación (ver métodos) se hacía una inmunodifusión doble de las fracciones I y II para comprobar la presencia o no de cadena J. Solamente la fracción I daba una banda de precipitación con un antisuero anticadena J monoespecífico (fig. 29). Esta fracción que contenía por tanto IgA polimérica producía una inhibición de la migración de PMNs dosis dependiente (fig. 30), perdiéndose totalmente después de la adsorción de la IgA con un inmunoadsorbente anti IgA humana. (fig. 31).

Aunque la mayor parte de la actividad inhibidora en los tres sueros se encontró en la fracción I, también se encontró en un plasma algo de inhibición en la fracción II (frac. I: 33,6% vs 16,8% frac. II) (fig. 28). Después de adsorber la IgA todavía había una inhibición residual del 5%.

Teniendo en cuenta que los ICs de IgA o IgG también son posibles inhibidores de la migración de PMNs (91, 104 y 105) se determinó la presencia de ambos tipos de ICs en las diferentes fracciones. En un paciente se detectaron ICs de IgA de un tamaño mayor que 690.000 D (fig. 28), precisamente las fracciones con mayor actividad inhibitoria de la migración dirigida de los PMNs. Este efecto podía ser atribuido a los ICs en sí o a la presencia de IgA polimérica en esos ICs detectada por una técnica anteriormente descrita (ver 4.2.5.). Otros inmunocomplejos de tamaño intermedio tenían un efecto inhibidor menor (fracción 2, fig. 28) o no tenían ninguno (fracciones 7-8 fig. 32). En este último suero las fracciones donde la IgA polimérica aparece (alrededor de 11S) (fracción 5, fig. 32) mostraban un efecto inhibitorio significativo sin que se detectaran ICs de IgA o IgG. Además, recordemos que el porcentaje de ICs de IgA en estos pacientes varía entre un 11 y un 40% según la técnica empleada y el de los ICs de IgG fue del 55%, mientras que la inhibición de la migración de los PMNs ocurrió en todos los plasmas de los pacientes estudiados. La actividad inhibidora residual observada en la fracción 2, fig. 28, al adsorber la IgA puede ser debida a la existencia de ICs de IgG en esta fracción.

Dado que la IgA polimérica o agregada presente en el plasma humano normal podría inhibir la migración de PMNs normales (184), se podría objetar que los resultados aquí presentados no tienen ninguna significación. Pero hay que tener en cuenta que la cantidad de plasma humano normal necesario para obtener IgA polimérica suficiente para detectar una actividad inhibitoria, es 2-3 veces mayor que la utilizada con plasmas de pacientes con la enfermedad de Berger. En este sentido, la fracción I obtenida de 5 ml de plasma de un pool de 10 sujetos normales en las mismas condiciones que los plasmas de los pacientes, tenía una concentración de cadena J indetectable por inmunodifusión doble dimensional y el índice quimiotáctico de 15 plasmas normales no fraccionados era de 135 vs 142 con M199 y no se observó inhibición de la migración de PMNs en las fracciones obtenidas entre 150.000 y  $1.5 \cdot 10^6$  D.

Por tanto, todos los experimentos parecen indicar que la inhibición de la migración de los

Tabla XVI. INHIBIDORES DEL MOVIMIENTO DIRIGIDO DE PMNs EN EL PLASMA

Plasma	Pacientes	Controles	P
Fresco	32 ± 30 (8) //	119 ± 40 (8)	p < 0.0005
Inactivado ++	4.4 ± 9 (8)	90 ± 25 (6)	p < 0.0005

// El índice del movimiento dirigido (media ± desviación estandard) se midió sobre neutrófilos normales tal como se describe en Métodos.  
 + Prueba U de Mann Whitney  
 ++ Calentando a 53°C durante 30 min  
 ( ) nº de pacientes

151



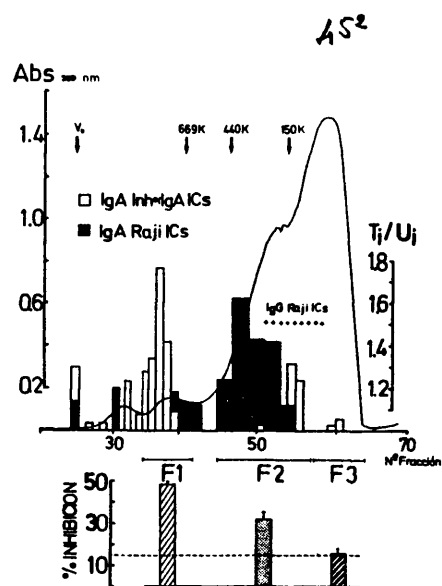


Fig. 28.— Inhibición del movimiento dirigido por un suero de un paciente con la enfermedad de Berger, después del fraccionamiento en una columna de Ultrogel AcA22 (2,6 x 70 cm.) equilibrada con PBS. F1 es la fracción que contiene ICs de IgA detectados por las células Raji y por las inhibición de la anti-IgA y tiene un peso molecular entre 700.000 y  $1,5 \times 10^6$  D. F2 es la fracción que contiene ICs de IgA e IgG con pesos moleculares entre 150.000 y 600.000 D. F3 es la fracción que contiene cantidades mínimas de ICs de IgA e IgG con pesos moleculares por debajo de 150.000 D. La línea discontinua de la parte inferior de la figura muestra el límite superior (Media  $\pm$  2 Desviaciones standard) de la inhibición del movimiento dirigido obtenido incubando las células con medio TC 199.

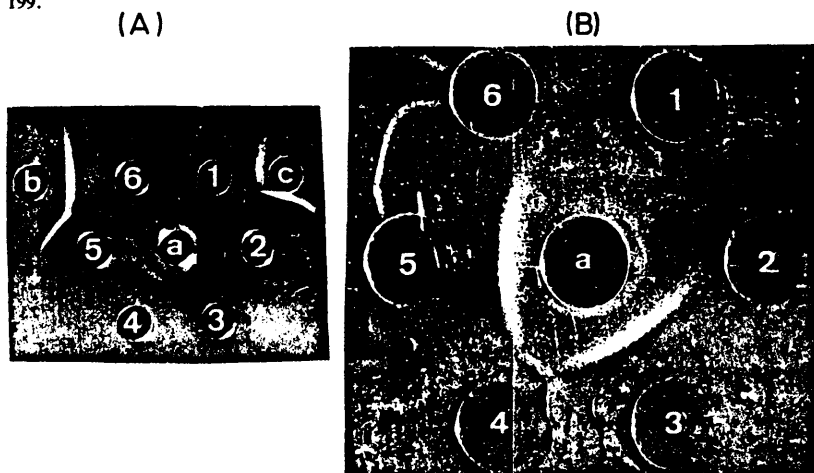


Fig. 29.— (A) Detección de la cadena J por inmunodifusión radial. Pocillos: (a) Anti-cadena J, (1) y (3) IgM reducida y alquilada, (2) IgM sin reducir, (4) y (6) F1 de la fig. 28 reducida y alquilada, (5) F1 sin reducir, (c) anti-IgM, (b) anti-IgA. (B) Detección de la cadena J: (a) anti-cadena J, (1) Fracción 7 y 8 de la fig. 32 sin reducir (2) Id. reducida y alquilada, (3) y (5). Fracción 7 y 8 de la fig. 32 reducida y alquilada, (4) y (6) Id. sin reducir.

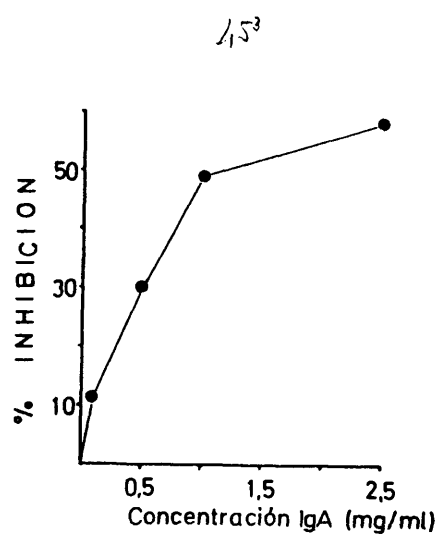


Fig. 30.— Dosis dependencia de la inhibición del movimiento dirigido inducido por la IgA 9-17 S de un paciente con la enfermedad de Berger.

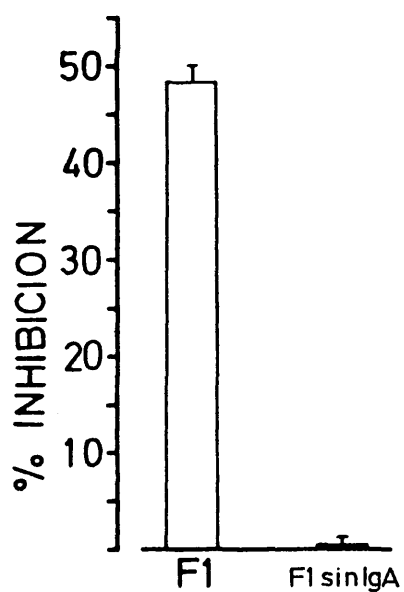


Fig. 31.— Efecto de la adsorción de la IgA polimérica de un paciente con la enfermedad de Berger sobre el movimiento dirigido de los PMNs normales. En la parte izquierda de la figura se representa la inhibición de la F1 de la fig. 28 antes de adsorber la IgA. A la derecha se representa la misma fracción sin IgA. Las barras representan la desviación standard de dos experimentos diferentes.

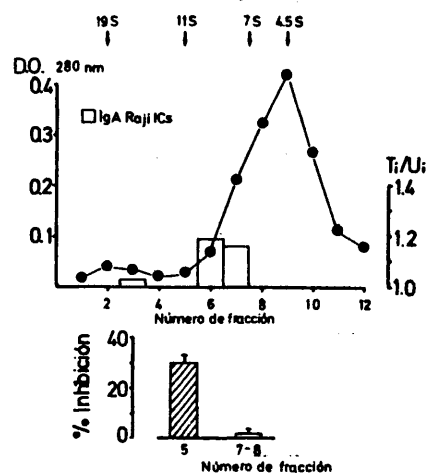


Fig. 32.— Inhibición del movimiento dirigido inducido por el suero de un paciente después de una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (5-40%). Solamente se detectaron ICs de IgA por el método de las células Raji. La fracción 5, donde se espera, que la IgA polimérica aparezca, no tenía ICs de IgA pero mostraba el mayor porcentaje de inhibición. Las fracciones 7 y 8 que contenían ICs de IgA de pequeño tamaño pero no tenía IgA polimérica no producía ninguna inhibición.

neutrófilos por el suero de los pacientes con la enfermedad de Berger, está completamente unido a la IgA, principalmente sus fracciones poliméricas, ya sea en forma de inmunocomplejos o no.

#### 4.3.3. *Función fagocitaria y quimiotáctica de los PMNs de los pacientes con la enfermedad de Berger.*

Dado que la acción del plasma de estos pacientes sobre la degranulación (175 y 177) y la migración dirigida de los PMNs normales no va acompañada de una fagocitosis efectiva de la IgA, se podría pensar en una alteración funcional permanente de los PMNs. Sin embargo, ni la fagocitosis de agregados de IgG, ni la liberación de  $\beta$ -glucuronidasa subsiguiente está alterada en los PMNs de estos pacientes (Tabla XVII). Así mismo, los PMNs migran normalmente frente a diferentes estímulos quimiotácticos y la migración al azar tampoco está alterada (Tabla XVIII). Por último, la actividad quimiotáctica espontánea generada por los plasmas frescos y sin activar de los pacientes era significativamente mayor que la de los plasmas controles (Tabla XIX), probablemente por una activación del complemento in vivo. (113).

#### 4.4. Manejo de la IgA por el sistema mononuclear fagocítico (SMF).

##### 4.4.1. *Aislamiento de IgG.*

En la fig. 33a se representa el perfil de elución de una IgG humana obtenida después de pasar por una columna de celulosa DEAE-DE-52 equilibrada en tampón fosfatos 0,01 M pH 8,0, un suero de mieloma de IgG humano, precipitado previamente con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 50%, pH 7,4, y equilibrado en el mismo tampón. La IgG se detectó por inmunodifusión doble dimensional frente al un suero de conejo anti-cadenas  $\gamma$  humanas (Operon, España), y se hizo un pool de aquellas fracciones que daban una banda de precipitación. Se concentró por ultrafiltración hasta una concentración de 10 mg/ml y se comprobó la pureza de la muestra por IEF con diversos antisueros monoespecíficos (fig. 33b). El coeficiente de sedimentación (7S) se determinó por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (5–40%) según técnica (3.2.3.).

##### 4.4.2. *Aislamiento de IgA monomérica.*

En la fig. 34 a, está representado el perfil de la IgA monomérica policlonal eluida de una columna de celulosa DEAE-DE-52 con tampón fosfatos 0,05 M pH 7,0 de un suero de un cirrótico con una hipergammaglobulinemia de IgA e IgG. (previamente, el suero había sido precipitado con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 50% p/v pH 7,4 y la IgG eluida pasando la fracción  $\gamma$ -globulínica por la misma columna de celulosa, equilibrada con tampón fosfatos 0,015 M pH 7,5). Después de lavar exhaustivamente la columna con el tampón de elución, se recogían las fracciones donde se detectaba IgA por inmunodifusión doble bidimensional, con un suero de conejo anti-cadenas  $\alpha$  humanas, se concentraban hasta el volumen original y se pasaba por una columna de Ultrogel AcA 34 equilibrada en PRS para eliminar posibles contaminantes de mayor o menor peso molecular (fig. 34 b). El pico donde eluía la IgA se concentraba hasta obtener una concentración de IgA de 10 mg/ml. y se comprobaba el grado de pureza por IEF de forma similar a la IgG (fig. 34 C). Cuando se detectaba alguna impureza (generalmente IgG) la muestra se purificaba de nuevo pasándola por un inmunoabsorbente anti-cadenas  $\gamma$  humanas (fig. 34 b).

##### 4.4.3. *Aislamiento de IgA polimérica.*

Para obtenerla, era necesario eluir las proteínas unidas a la celulosa DE-52 (después de aislar la IgA monomérica) con un gradiente de molaridad, partiendo de tampón fosfatos 0,05 M pH 7,0 y como tampón limitante NaCl 0,2M en fosfatos 0,05 M pH 7,5. En la fig. 35 a se observa el

Tabla XVII. FUNCION FAGOCITARIA DE PMNs DE PACIENTES CON LA ENFERMEDAD  
DE BERGER Y CONTROLES

	<u>% fagocitosis</u> ▲	<u>% <math>\beta</math> glucuronidasa liberada</u> ▲▲▲
Pacientes n= 13	25,81 $\pm$ 1,9▲▲	16,27 $\pm$ 3,5
Controles n= 8	24,63 $\pm$ 3,04	15,64 $\pm$ 6,23
▲ % de cpm unidas a $1 \times 10^7$ celulas respecto al total añadido		
▲▲ Media $\pm$ Desviación estandard		
▲▲▲ % de liberación respecto a la lisis total de $1 \cdot 10^7$ células		

Tabla XVIII. INDICES DEL MOVIMIENTO DE LOS PMNs DE CONTROLES Y PACIENTES CON LA ENFERMEDAD DE BERGER.

	Movimiento dirigido		
	Movimiento al azar	Caseína	Pool de plasmas controles + +
Controles	137,3 ± 52 ( 26 ) //	187 ± 70 ( 29 )	180 ± 42 ( 27 )
	n.s. ‡	n.s.	n.s.
Pacientes	141,5 ± 42 ( 22 )	185,2 ± 48 ( 31 )	212,8 ± 52 ( 31 )

16<sup>2</sup>

// Indice del movimiento ( media ± desviación standard ).

‡ Test-U de Mann-Whitney.

+ + Activados por la vía alterna.

( ) nº de pacientes.

Tabl XIX., ACTIVIDAD QUIMIOTÁCTICA DEL PLASMA EN LOS PACIENTES CON LA ENFERMEDAD DE BERGER

Actividad citotáctica	Plasma		p*
	Pacientes	Control	
Espontánea	217 + 72 ( 14 ) //	97 + 33 ( 14 )	0.001
Vía clásica	138 + 31 ( 16 )	154 + 39 ( 16 )	n.s.
Vía alterna	251 + 90 ( 15 )	209 + 35 ( 14 )	n.s.

// Indices del movimiento. Fue medido sobre PMNs normales tal como se describe en Métodos ( Media + Desviación standard.

\*Prueba-U de Mann-Whitney.  
( ) nº de pacientes.

164

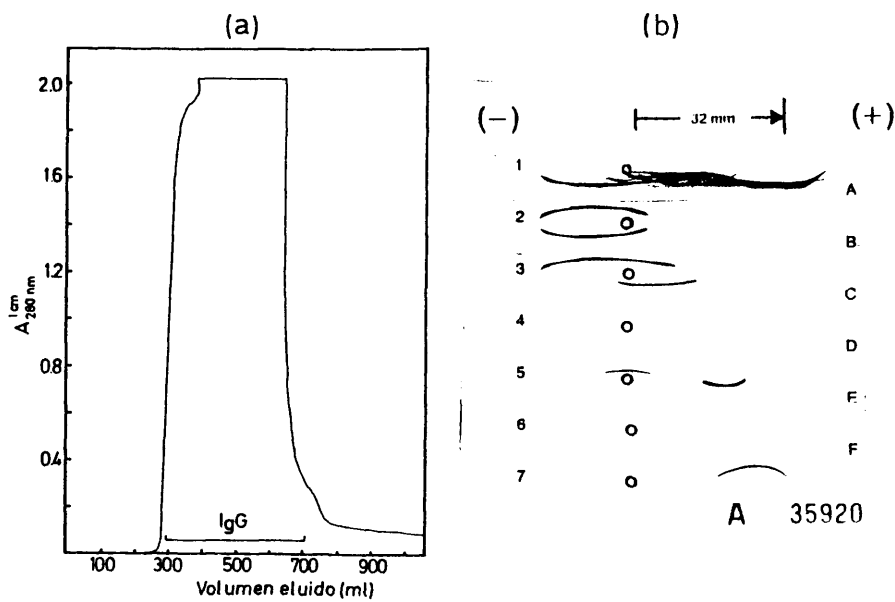


Fig. 33. (a) Perfil de elución de una IgG humana de una columna de Celulosa DEAE (DE-52 Whatman, 5 x 30 cm) equilibrada con fosfatos 0.01 M pH 8.0 (b) Inmunoelectroforesis de la IgG eluida en la columna anterior concentrada a 10 mg/ml. En los pocillos 1,3,5 y 7 se puso un suero humano normal (Quantitrol, Kallestad) y en los pocillos 2, 4 y 6 la muestra problema. En las trincheras se puso: (A) antisuero humano total, (B) anti-IgG, (C) anti-IgA, (D) anti-IgM, (E) anti  $\alpha$ 2 macroglobulina, (F) anti- $\alpha$ 1 antitripsina.



perfil obtenido. Las fracciones positivas para IgA se concentraban hasta 10 mg/ml y se comprobaba la pureza por IDD. Como contaminantes principales había IgM e IgG que eran eliminadas mediante filtración en Ultrogel AcA22 (fig. 33 b). De nuevo las fracciones positivas para IgA pero negativas para IgM e IgG eran concentradas y comprobada la pureza por IEF (fig. 35 c).

#### 4.4.4. Aclaramiento sanguíneo de los agregados de IgA (A-IgA) e IgG (A-IgG).

Se prepararon agregados solubles de IgA o IgG según la técnica descrita en 3.6.1., seleccionando aquellos que tenían un peso molecular similar ( $1-2 \cdot 10^6$  D) mediante filtración en columna de Ultrogel AcA22 (fig. 36).

El aclaramiento sanguíneo de A-IgA y A-IgG inyectados i.v. a ratones normales (3.6.2) se muestran en la fig. 37. Ambos agregados eran eliminados de la sangre rápidamente según una recta (en coordenadas semilogarítmicas) durante los primeros cinco min., al cabo de los cuales, el 80% de la A-IgG y A-IgA había sido eliminada de la circulación. Sin embargo, desde los 60 min. hasta las 24 h después de la inyección, había diferencias significativas entre la eliminación de las dos proteínas, siendo más lento el de la A-IgA que el de la A-IgG ( $t_{1/2} = 10,03$  vs  $7,52$  h. respectivamente). Las cpm contadas en sangre durante estos períodos fue considerada como verdaderos agregados, porque eran TCA precipitables en más del 94%.

#### 4.4.5. Captación tisular de la A-IgA y A-IgG.

A los 5, 10, 30, 60 min y 24 h después de la inyección de los agregados, el hígado, el bazo, riñones y pulmones eran procesados como se describe en métodos, ver sec. (3.6.2.). Los porcentajes de A-IgA y A-IgG depositados en el hígado en relación a la dosis total inyectada se expresa en la fig. 38 a. El porcentaje de radioactividad a los 5 min. era aproximadamente el mismo para ambos agregados. Sin embargo, a partir de los 30 min. iniciales, la cantidad de A-IgA depositada en el hígado era significativamente más grande que la A-IgG hasta 24 h después de la inyección. Estos datos sugieren que la A-IgG depositada en el hígado era eliminada rápidamente, siendo la tasa de eliminación y/o catabolismo más alta que la tasa de captación. Por el contrario, durante la primera hora de inyección, la cantidad de A-IgA en el hígado era la misma. Estos resultados pueden interpretarse como que la IgA depositada era removida y/o catabolizada muy lentamente, al menos al principio, y/o que la tasa de captación hepática de A-IgA era más alta que la tasa de aclaramiento.

La captación renal se describe en la fig. 38 b. Aunque a los 5 min., la A-IgA depositada en el riñón no era significativamente más alta que la A-IgG, el comportamiento de ambos agregados en este órgano es paralela a la del hígado; es decir, la tasa de eliminación y/o catabolismo de la A-IgG era siempre más rápida que el de la A-IgA.

La cantidad de agregados depositados en el bazo y pulmones a los cinco minutos era del 1-2% de la radioactividad total inyectada, no habiendo diferencias significativas durante los períodos estudiados (datos no mostrados).

#### 4.4.6. Catabolismo de la A-IgA y A-IgG depositada en el hígado y riñón.

Los cortes de hígado y riñón de ratones inyectados con A-IgG y A-IgA, eran incubados durante 4 h a  $37^\circ\text{C}$  y se comparaba el catabolismo neto de los agregados. Los datos de 3 experimentos diferentes están resumidos en la fig. 39. El catabolismo hepático de la A-IgG era significativamente más alto que el de la A-IgA ( $29,4 \pm 2,5$  vs  $11,54 \pm 4,26$   $p < 0,01$ ). El catabolismo renal de la A-IgG fue solamente del  $4,36 \pm 4,3\%$  de la A-IgG depositada. El catabolismo de la A-IgA era prácticamente nulo. Cuando se inyectaban dosis más altas había diferencias similares.

#### 4.4.7. Unión y catabolismo de la A-IgG y A-IgA por macrófagos peritoneales.

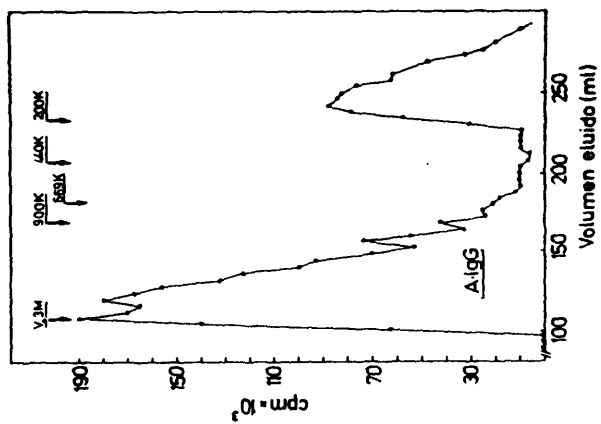


Fig. 36. Perfil de elución de los agregados por el calor de IgG de una columna de Ultrogel AcA22 (2.6 x 70 cm) equilibrada con Tris 0.01 M, NaCl 0.15 M pH 7.4 con BSA al 0.5%. La posición de los marcadores se indica en la parte superior de la figura: Azul Dextrano ( $V_o \approx 3.16^{\circ} D$ ); IgM (900.000); Tiroglobulina (669.000); Ferritina (440000) y Aldolasa (200000).

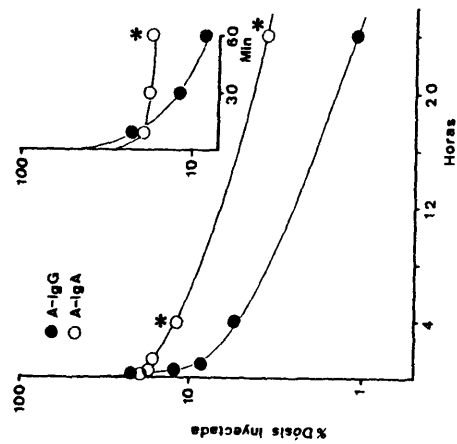


Fig. 37. Aclaramiento sanguíneo de A-IgG (●) o A-IgA (○) inyectados i.v. a ratones. Cada punto representa la media  $\pm$  desviación estándar de tres ratones. El aclaramiento de la A-IgA era significativamente más lento que el de la A-IgG entre 1 h ( $p < 0.0025$ ) y 24 h ( $p < 0.05$ ) (t-test de Student para datos no emparejados).

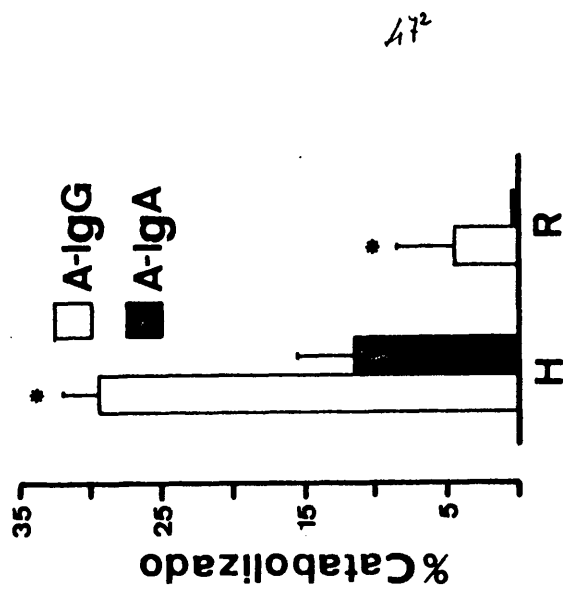
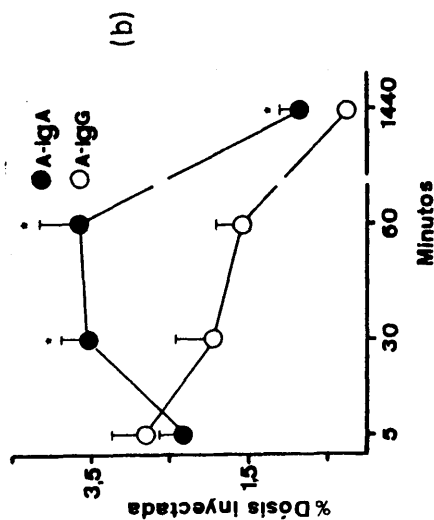
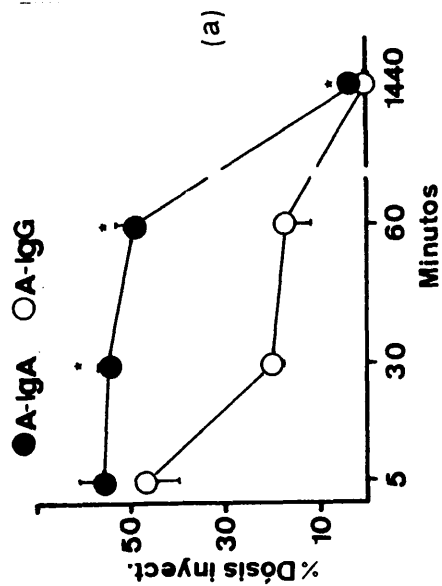


Fig. 39. Catabolismo de la A-IgG □ o de la A-IgA (■) depositada en el hígado (H) o en los riñones (R) después de una incubación de 4 horas a 37°C. Los valores representan la media  $\pm$  DS de tres experiencias diferentes.

Fig. 38. (a) Captación y eliminación de A-IgA (●) o A-IgG (○) por el hígado después de la inyección i.v. de los agregados. Cada punto es la media  $\pm$  desviación standard de tres ratones. \*  $p < 0.0005$  (t de Student para datos no emparejados). (b) Id. para los riñones. \*  $p < 0.01$  (t de Student para datos no emparejados).

Los experimentos se realizaron en presencia de suero fresco de cobaya al 10%, suero inactivado por el calor o con solución salina tamponada (PBS). A las tres dosis que se probaron (1,5 y 10 mg de A-IgG) los macrófagos peritoneales unían y catabolizaban cantidades significativamente más grandes de A-IgG que de A-IgA en presencia de PBS (fig. 40).

En presencia de suero fresco de cobaya al 10%, había un incremento en la unión de la A-IgG a los macrófagos, (desde un  $22,6 \pm 1\%$  hasta  $42,8 \pm 1,6\%$ ). No se observaron cambios en la fracción catabolizada ( $18,2 \pm 3,5\%$  vs  $17,3 \pm 2\%$  respectivamente). La unión a los macrófagos de ambos agregados era similar en presencia de suero inactivado por el calor que con tampón, por tanto, el incremento en la unión de la A-IgG a los macrófagos favorecida por el suero presumiblemente debe ocurrir por una activación del complemento. Este fenómeno no se observa con la A-IgA, no pareciendo que el complemento tenga algún papel en el procesamiento de estos agregados. Es más, la disminución de la unión y el catabolismo observados en presencia de suero fresco o inactivado, sugiere que, puede haber una inhibición competitiva inducida por la IgA del suero de cobaya. Como no observamos un consumo apreciable de la actividad hemolítica del complemento ( $CH_{50}$ ) después de la incubación del suero de cobaya con la A-IgA, parece poco probable su solubilización por efecto del complemento.

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados con agregados de IgA e IgG, podrían resumirse en que el menor aclaramiento sanguíneo de los agregados de IgA respecto a los de IgG y el mayor depósito en riñones son una consecuencia clara de un peor manejo de aquellos agregados con el sistema mononuclear fagocítico. Como se utilizó una IgA multimérica, no sabíamos si el comportamiento sería idéntico con agregados formados con IgA monomérica o polimérica exclusivamente, ni tampoco cómo afectaría la agregación por el calor a la unión de la IgA (monomérica o polimérica) a una serie de receptores celulares específicos claramente definidos en la literatura y que hemos comentado brevemente en la introducción (1.4. y 1.5.2.c.5.). En un intento de profundizar más en la relación de los ICs de IgA con el sistema mononuclear fagocítico y los hepatocitos realizamos las siguientes experiencias, utilizando agregados de IgA monomérica y polimérica y comparando su comportamiento con el de las mismas proteínas sin agregar.

#### 4.4.8. Aclaramiento sanguíneo de IgA polimérica y monomérica agregada o no.

El aclaramiento sanguíneo de las 4 proteínas inyectadas se muestra en la fig. 41. Se puede subdividir en dos componentes cada uno de ellos agrupando a todos los puntos que se ajustan a una recta en coordenadas semilogarítmicas y que por tanto, tienen una velocidad de aclaramiento similar. Después de la agregación, la vida media del componente más rápido de la IgA<sub>m</sub> disminuye de 2,5 h hasta 4,2 min., mientras que aumenta la proporción de proteína que desaparece de la circulación sanguínea, con esta tasa de aclaramiento (desde un 75% hasta un 80%). La vida media del componente rápido de la IgA<sub>p</sub> disminuye desde 22 min. a 1,8 min y la proporción de proteína con esta tasa de aclaramiento (desde un 89% hasta un 81%). Es decir, nuestros resultados mostraban que la agregación de las proteínas provocaba un incremento significativo en su aclaramiento del plasma sanguíneo, siendo la A-IgA<sub>p</sub> la que tenía una velocidad de aclaramiento mayor, dos veces superior a la de la IgA monomérica agregada.

El componente más lento de la curva, también llamada "fase de eliminación o de catabolismo", también se ve afectada por la agregación. Así, había una disminución de la vida media de la IgA<sub>m</sub> desde 22,3 horas hasta 10,03 horas, mientras que el de la IgA<sub>p</sub> sólo variaba ligeramente (desde 12,38 h a 10,09 h). En conjunto estos resultados parecen indicar que la agregación no sólo favorece el aclaramiento inicial de las proteínas inyectadas (primera fase de la curva) sino que también aumenta el catabolismo posterior determinado por la segunda fase de la curva del aclaramiento sanguíneo.

#### 4.4.9. Captación específica por los órganos.

Dado que se ha observado que la IgA<sub>p</sub> es captada por el hígado por un mecanismo activo,

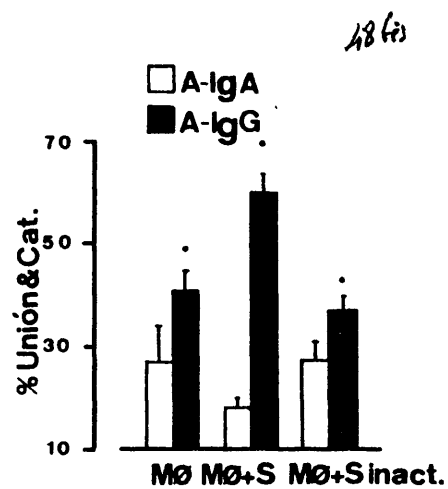


Fig. 40. Unión y catabolismo de A-IgG (■) o A-IgA (□) por macrófagos peritoneales incubados durante 3 h a 37°C. Mo: Macrófagos incubados con los agregados en presencia de tampón: Mo + S: Macrófagos incubados con agr. y suero de cobaya fresco al 10%. Mo + S inact.: Id en presencia de suero de cobaya calentado a 56°C durante 30 min. Los valores representan la media  $\pm$  DS de tres experimentos diferentes. \*  $p < 0.025$  (t de Student no emparejada).

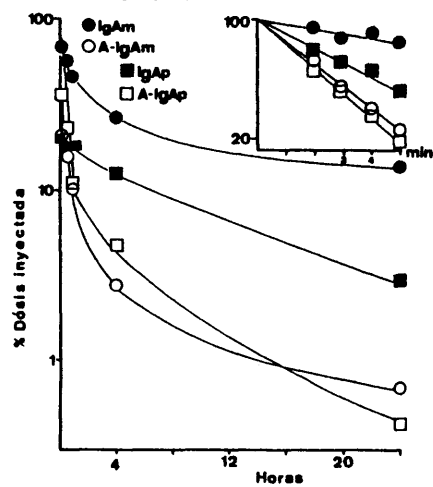


Fig. 41. Aclaramiento sanguíneo de IgAm (●), A-IgAm (○), IgAp (■) y A-IgAp (□) inyectados i.v. en ratones. Cada punto representa la media  $\pm$  DS de tres ratones.

apareciendo posteriormente en la bilis, decidimos estudiar el depósito tisular de la IgAp e IgAm agregadas para determinar de qué modo afectaba la agregación a dicho mecanismo. A los cinco min. de la inyección (fig. 42 a), el porcentaje de radioactividad depositada en el hígado fue del 50–60% para ambos agregados, no habiendo diferencias estadísticas entre ellos. Por el contrario, la captación de la IgAp no agregada era significativamente más alta que la IgAm. La tasa de eliminación y/o catabolismo, expresado por la caída de cpm observada a partir de los 5 min. fue significativamente más lenta para la A–IgAp hasta las 14 h después de la inyección.

La captación renal de las proteínas se detalla en la fig. 42 b. Cinco minutos después de la inyección, la IgAp agregada o no, se deposita en mayor cantidad que la IgAm. Además la eliminación y/o catabolismo de la A–IgAp era significativamente más lento que las otras proteínas hasta las 24 h de seguimiento. El hecho de que los niveles sanguíneos de IgAm eran siempre más elevados que los de la A–IgAp, pero su depósito menor, sugieren que el tamaño y probablemente sus características fisicoquímicas diferentes (ejemplo: carga), podían ser importantes para determinar el depósito renal.

La cantidad de IgAm depositada en el bazo y en los pulmones era prácticamente nula. Después de la agregación menos del 1% de la A–IgAm inyectada se depositaba en ambos órganos. Por el contrario, alrededor del 10% de la IgAp se encontraba en los pulmones a los cinco minutos después de inyección y un 3% de la IgAp permanecía cuatro horas después. Sin embargo, la agregación de esa proteína provocaba una disminución del 9% en la captación por los pulmones. El incremento en la captación esplánica después de la agregación fue desde un 0,2% hasta un 1,5% (datos no mostrados).

#### 4.4.10. Estudios de inhibición cruzada *in vivo*.

Estudiamos la especificidad de la captación hepática de esas proteínas, mediante una inyección de un exceso de IgG agregada (A–IgG). Esta dosis producía un incremento de los niveles sanguíneos de  $5 \mu\text{g}$  de  $^{125}\text{I}$ –IgG desde un  $18 \pm 1,7\%$  hasta  $30 \pm 13,6\%$  a los 30 min. Como puede verse en la fig. 43, la captación hepática de la IgAm podía ser bloqueada en un 40%, mientras que la IgAp era bloqueada en un 25%. Por el contrario, la captación hepática de la IgAm o IgAp no estaban prácticamente afectadas. Dado que la A–IgG es manejada principalmente por las células de Kupffer del hígado (128), estos resultados sugieren que los agregados de IgA (polimérica o monomérica) deben ser también aclarados en parte por las células mononucleares del hígado, mientras que la IgA no agregada (polimérica o no) se debe eliminar por otras células como los hepatocitos o bien a través de receptores diferentes del receptor para el Fc de la IgG en las células de Kupffer.

#### 4.4.11. Unión de las diferentes proteínas a los hepatocitos.

Era por tanto interesante determinar si la IgAp podía unirse a los hepatocitos después de la agregación y si tal unión estaba mediada SC. Utilizando hepatocitos aislados confirmamos que la IgAp se unía significativamente más a los hepatocitos que el resto de las proteínas (fig. 44), y además observamos que había una disminución de al menos 5 veces en la unión de la IgAp por efecto de la agregación. No había diferencias entre la unión de la IgAm y de la A–IgAm (alrededor del 1%). La unión de la IgA secretoria y de la A–IgG era del  $3,27 \pm 0,06$  y  $2,27 \pm 0,77$  respectivamente, (fig. 44).

Se determinó la unión en un rango de concentraciones, desde  $10$  hasta  $40 \mu\text{g}/3 \cdot 10^5$  células (fig. 45), para ver si había una dependencia de la concentración. Efectivamente, la unión de la IgAp era dosis dependiente: no alcanzándose una meseta incluso con dosis mayores de  $100 \mu\text{g}$ . Por el contrario la unión de la A–IgAp y de la IgAm era mucho menor que la de la IgAp, alcanzando la IgAm una meseta con dosis mucho menores.

Para tratar de saber si la unión de estas proteínas a los hepatocitos era a través de receptores diferentes, realizamos experiencias de inhibición competitiva en las cuales la IgAp, A–IgAp o

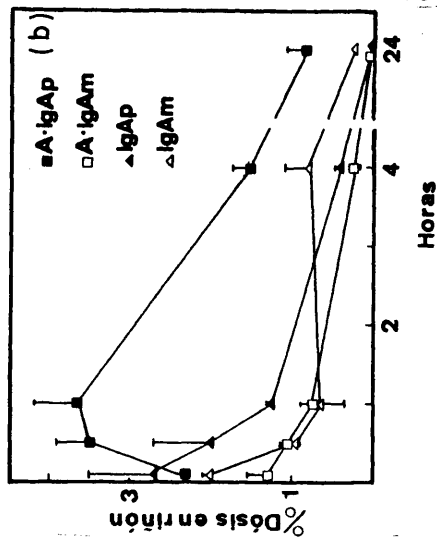
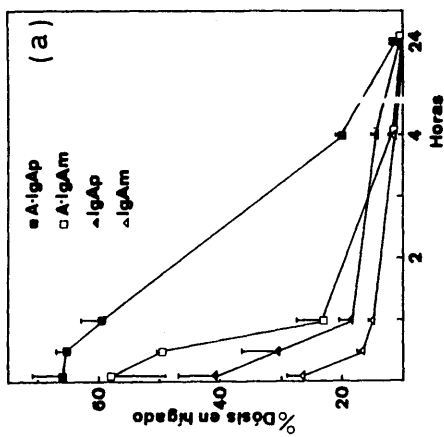


Fig. 42. (a) Captación y eliminación de A-IgAp (■), A-IgAm (□), IgAp (▲), IgAm (△) por el hígado después de la inyección de 5 µg de proteína. Cada punto representa la media ± DS de tres ratones. (b) Id en riñones.

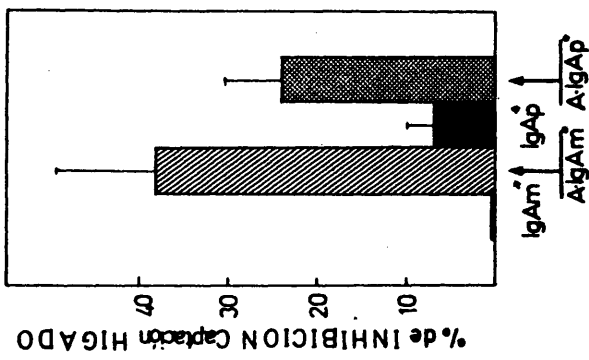


Fig. 43. Efecto de la inyección de 3 mg de A-IgG en la captación hepática de IgAm (■), A-IgAm (□), IgAp (▲), A-IgAp (△). La supresión de la captación hepática se calculó mediante la fórmula:

$$\frac{\text{Captación esperada} - \text{Captación observada}}{\text{Captación esperada}} \times 100$$

Los valores representan la media ± DS de tres ratones.

192

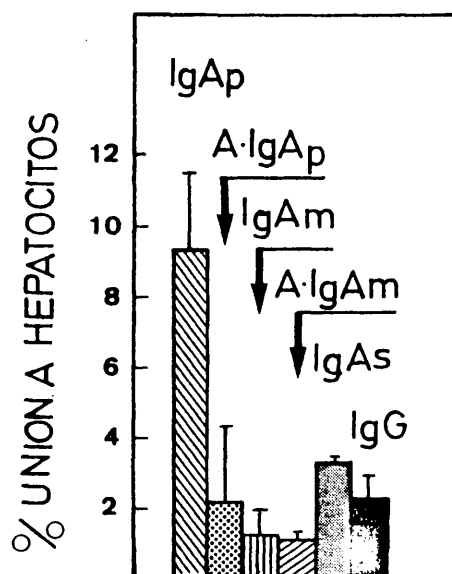


Fig. 44. Unión de IgAp (■), A-IgAp (■), IgAm (■), A-IgAm (■), IgAs (■), A-IgG (■) a los hepatocitos aislados después de una incubación de 30 min a 22°C. Los valores representan la media  $\pm$ DS de cinco experimentos realizados en días diferentes.



49<sup>3</sup>

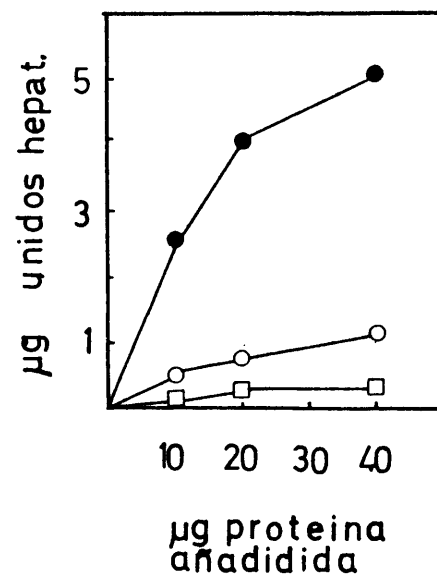


Fig. 45. Unión de diferentes concentraciones de IgAp (●), A-IgAp (○) y IgAm (□) a hepatocitos aislados después de una incubación de 30 min a 22°C. Cada punto representa la media  $\pm$ DS de tres experimentos.

IgAm marcadas con  $^{125}\text{I}$  en dosis muy pequeñas se incubaban en presencia o en ausencia de una dosis 100 veces mayor de IgAp o A-IgG no marcados. Como vemos en la fig. 46, la IgAp no marcada induce a una inhibición del 90% de la unión de la  $^{125}\text{I}$ -IgAp mientras que se obtuvo menos del 20% de inhibición cuando se utilizó A-IgG. Por el contrario, la IgAp inhibía cerca de un 20% la unión de la  $^{125}\text{I}$ -A-IgAp mientras que la IgAp o A-IgG no inhibían la unión de la  $^{125}\text{I}$ -IgAm. La A-IgG tampoco inhibía la unión de la  $^{125}\text{I}$ -A-IgAp.

Por tanto, los experimentos de inhibición competitiva son compatibles con la hipótesis de que la IgA polimérica o monomérica se unen a los hepatocitos a través de diferentes receptores. La menor unión de la A-IgAp comparada con la IgAp y la poca habilidad de ésta para inhibir la unión de la A-IgAp indica que la propiedad de la IgAp de unirse a los hepatocitos por medio del SC está muy reducida por efecto de la agregación. La poca inhibición inducida por la A-IgG sobre la unión de la IgAp, A-IgAp o IgAm está de acuerdo con la idea de que la IgG e IgA se unen a los hepatocitos a través de receptores para el Fc diferentes (81).

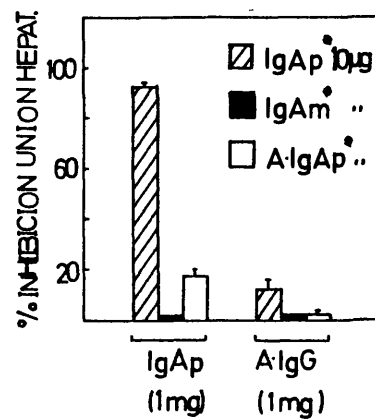


Fig. 46. Efecto de la IgAp o A-IgG (1 mg) sobre la unión de 10 ug de  $^{125}$ I-IgAp ( $\square$ ),  $^{125}$ I-IgAm ( $\blacksquare$ ),  $^{125}$ I-A-IgAP ( $\square$ ) a hepatocitos aislados después de una incubación de 30 min a 22°C. Los valores representan la media  $\pm$  DS de tres experimentos.

## 5. DISCUSION

Tanto la enfermedad de Berger como el síndrome de Schönlein–Henoch tienen muchas características en común (143 y 214). Clínicamente sólo las manifestaciones extrarrenales parecen separar una enfermedad de otra. La IgA parece jugar un papel central en ambas entidades aunque no se sepa cuál es con exactitud.

La IgA sérica está elevada en el 50–70% de los pacientes con la enfermedad de Berger (29, 35, 43, 48 y 206), no encontrándose ninguna correlación entre los niveles de IgA y los parámetros clínicos o histológicos. Parece característico de esta enfermedad el mantener siempre unos niveles altos o bajos de IgA sérica contrariamente a lo que ocurre en los pacientes con el síndrome de Schönlein–Henoch en los cuales los niveles elevados de IgA se correlacionan con las fases agudas bajando a niveles normales después de la desaparición del brote (199). Además, por razones desconocidas, la IgA sérica tiende a ser más baja en pacientes con insuficiencia renal (48). Algunos autores han relacionado los niveles elevados de IgA sérica con un curso favorable de la enfermedad (43), no encontrando una relación entre la IgA elevada y el sistema HLA (48).

El incremento de los niveles de IgA sérica no es específico de estas nefropatías, porque valores similares o incluso más elevados se han encontrado en otras glomerulonefritis como en el lupus eritematoso sistémico e incluso en glomerulonefritis sin depósitos de IgA (50).

La relación entre la IgA y las enfermedades hepáticas, concretamente con la cirrosis alcohólica, se ha discutido durante los últimos años (2, 10, 92 y 98). Se ha encontrado frecuentemente un incremento policlonal de IgA e IgG probablemente contra antígenos adsorbidos a través del intestino (185). Los niveles de IgA se han correlacionado con el daño hepático (92) y se ha observado una producción aumentada de IgA e IgG en linfocitos procedentes de pacientes con cirrosis alcohólica e hipergammaglobulinemia (12). Los pacientes con enfermedades hepáticas tienen secundariamente glomerulonefritis (25 y 145) y el depósito predominante de la IgA en glomérulo es muy destacable. En una serie el 61% de los pacientes con cirrosis hepática (el 90% de los cuales tenían cirrosis alcohólica) presentaban, en el momento de la autopsia, depósitos granulares de IgA en el glomérulo (10).

La posibilidad de que existiera una IgA sérica anormal en la enfermedad de Berger había sido sugerida por otros autores (11 y 114), pero nuestro grupo fue el primero en aportar un estudio detallado de las características bioquímicas de la IgA de esta nefropatía (120 y 121). El 70% de los pacientes tenían un incremento de la IgA con coeficientes de sedimentación mayores que 9 S. El tratamiento de los sueros a pH ácido sólo reducía parcialmente esta proporción, indicando la presencia de ICs de IgA.

Igualmente en el síndrome de Schönlein–Henoch y en la cirrosis alcohólica hay un aumento porcentual y en valores absolutos de la IgA polimérica (ver 4.1.). El hecho de que en las tres enfermedades haya individuos que tienen unos valores normales, sugiere la necesidad de hacer estudios seriados para comprobar si es una característica permanente. Al estudiar en dos ocasiones diferentes a dos pacientes con la enfermedad de Berger, no sometidos a ningún tratamiento, los resultados fueron desiguales. En uno de ellos la IgA polimérica permanecía por encima de los controles en un intervalo de 9 meses, mientras que en el otro pasaba de tener inicialmente una IgA polimérica normal a un incremento de tres veces por encima de los controles.

Las características inmunoquímicas (tamaño, subclase) de la IgA depositada en el glomérulo en las tres enfermedades todavía no está totalmente establecido. La enfermedad de Berger y el síndrome de Schönlein–Henoch se producen a menudo, después de infecciones de las vías respiratorias altas o trastornos gastrointestinales; y en la cirrosis alcohólica se ha detectado ICs circulantes contra antígenos alimentarios. Parecía, por tanto, probable que la IgA depositada procediera de las secreciones externas, aunque solamente se ha podido encontrar depósitos de IgA secretoria de forma ocasional (134). Otros autores han encontrado depósitos predominantes de IgA 2 (3) que no han podido ser confirmados (33). Nosotros hemos encontrado depósitos de IgA polimérica en el 80% de los pacientes con la enfermedad de Berger y en el síndrome de Schönlein–Henoch y en el 100% de

los pacientes con cirrosis alcohólica, siendo confirmados por Bene y col. (8) utilizando la misma metodología. Aunque estos hallazgos en sí son importantes, la técnica utilizada no permite más que una apreciación semicuantitativa de la proporción de IgA polimérica en relación al total de la IgA depositada.

Mediante la elución a pH ácido de la IgA depositada en los riñones de pacientes con cirrosis alcohólica hemos podido confirmar la presencia de IgA polimérica así como una disminución de la relación IgA monomérica: IgA polimérica, no siendo por tanto un mero reflejo de la IgA sérica. La fácil disociación a pH ácido sugiere que parte está depositada en forma de ICs.

Aunque se cree que los ICs circulantes tienen un papel patogénico en el desarrollo de las glomerulonefritis humanas, los resultados han sido conflictivos (18, 151 y 201). El depósito granular de la IgA en el mesangio de las tres enfermedades estudiadas en esta tesis sugería el depósito de ICs circulantes. Sin embargo, los primeros intentos de encontrarlos fueron infructuosos, tanto en la enfermedad de Berger (40, 180 y 201) como en el síndrome de Schönlein-Henoch (18). En la cirrosis alcohólica se habían detectado ICs de IgG (5, 101, 157 y 220) pero solamente en algunos de estos estudios también se describía la presencia de ICs de IgA (157 y 220).

El desarrollo posterior de técnicas específicas para la detección de ICs de IgA (99 y 119) ha confirmado su presencia en el síndrome de Schönlein-Henoch. Nuestro grupo fue uno de los primeros en ver que los pacientes con la enfermedad de Berger tenían ICs de IgA mediante una técnica poco utilizada en estudios rutinarios como es la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (120 y 121). Otros autores han descrito la presencia de ICs en esta nefropatía sin especificar si se tratan de ICs de IgA o IgG por técnicas no basadas en la fijación del complemento (64 y 190) y más recientemente Woodroffe y col. (220) pudieron detectar ICs de ambos tipos mediante la fijación del Clq.

Nosotros hemos utilizado cuatro técnicas para detectar ICs de IgA con diferentes propiedades en pacientes de las tres enfermedades oscilando entre un 11 y un 100% según la técnica empleada. La falta de correlación con la clínica de la mayoría de los ICs exceptuando los IgA Raji sugiere la necesidad de tener en cuenta otras características de los ICs tales como el tamaño, activación del complemento o la afinidad para asignarles un papel patogénico o simplemente para servir de indicadores de la enfermedad. La combinación en los ICs de IgA Raji de varias características diferenciales como pequeño tamaño, activación del complemento, poca precipitabilidad con PEG al 3,5% hacen que sean firmes candidatos para servir de indicadores de la actividad clínica en la enfermedad de Berger.

Cada técnica debe detectar un tipo de IC diferente, ya que hay escasa correlación entre ellas. Así, en la enfermedad de Berger, solamente un 20% de los pacientes con ICs de IgA por las células Raji también tienen ICs por la técnica de la inhibición de la anti IgA, sin precipitar con PEG 3,5%. La precipitación aumenta el porcentaje de pacientes que tienen ICs de ambos tipos, pero todavía más de la mitad de los pacientes con ICs IgA Raji no tienen ICs Inh-anti IgA, quizá por ser aquéllos poco precipitables y por tanto de pequeño tamaño. Esto fue confirmado posteriormente mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de muestras seleccionadas.

La disociación a pH ácido y posterior ultracentrifugación parece ser la técnica que mejor se correlaciona con el resto, indicando su idoneidad para detectar todo tipo de ICs, sin embargo, una parte de los pacientes con ICs Inh-anti IgA o Raji IgA no tienen simultáneamente ICs por ultracentrifugación a pH 2,8. Estos resultados parecen indicar que un porcentaje de los ICs tienen una fuerte afinidad por el antígeno y por tanto no son disociables en las condiciones empleadas o bien que una parte de lo que detectamos como ICs sea en realidad IgA polimérica o agregada.

El tamaño de los ICs detectados por las diferentes técnicas también parece ser diferente. Los ICs IgA Raji son los más pequeños (7-13 S), seguidos de los disociables a pH ácido (9-17 S) mientras que los inh-anti IgA son mayores que 13S. En la cirrosis alcohólica los ICs circulantes disociables a pH ácido tienen un tamaño más restringido (9-13 S) que los de la enfermedad de Berger, siendo sin embargo similares a los depositados en el mesangio.

Sorprendentemente los ICs de IgG son los más abundantes (55% de los pacientes). Teórica-

mente y teniendo en cuenta el efecto supresor de la IgA polimérica sobre la fagocitosis y quimiotaxis de los PMNs (ver 4.3.), uno puede imaginar que el aclaramiento de los ICs de IgG esté disminuido. Así mismo, la inyección de agregados de IgA a ratones demuestra que son eliminados por el sistema mononuclear fagocítico menos eficientemente que los agregados de IgG (ver 4.4.). Por tanto, la mayor persistencia de los ICs de IgG en comparación con los de IgA en los pacientes con la enfermedad de Berger, está a favor de un defecto en el aclaramiento de los ICs de IgG, posiblemente mediado por la IgA polimérica. En este sentido la evolución de estos ICs después del tratamiento con difenilhidantoína no fue homogéneo, disminuyendo en aquellos pacientes que tenían la IgA polimérica elevada antes del tratamiento y que como consecuencia de éste bajaba a niveles normales (49 y 51). En los pacientes que tenían la IgA polimérica normal o no les bajaba por efecto de la difenilhidantoína tampoco cambiaban los ICs de IgG.

Una dificultad adicional en la interpretación de los resultados sobre las ICs es la observación de que no todos son dañinos. La formación de ICs es un mecanismo fisiológico normal que sirve para eliminar rápidamente antígenos potencialmente peligrosos. Así, la formación de anticuerpos de gran afinidad del tipo IgG en la respuesta secundaria sirve para una rápida eliminación del antígeno en comparación con la formación de anticuerpos del tipo IgM de baja afinidad en la respuesta primaria. También la formación de ICs de IgA después de la comida parece ser un mecanismo fisiológico normal a la luz de los experimentos que hemos descrito en 4.2.6. y los realizados por otros (168).

En aquellos experimentos hemos observado que aunque se pueden formar ICs con otras inmunoglobulinas, la IgA polimérica podría tener un papel preponderante en la eliminación de antígenos procedentes de la alimentación. Así, los individuos normales formaron ICs de IgA polimérica contra la albúmina de huevo que se eliminó rápidamente de la circulación. La mayoría de los pacientes con la enfermedad de Berger estudiados por nosotros tenían previamente ICs circulantes de la clase IgA que eran modificables con la sobrecarga antigénica que supone la dieta hiperproteica. La brusca caída de los ICs de IgA Raji después de la sobrecarga pudo deberse a la formación de ICs de IgA de mayor tamaño y más fácilmente eliminables. También es posible que a tiempos más cortos fuera posible detectar ICs de IgA polimérica que se habrían eliminado rápidamente por la activación del complemento y/o la unión a los hepatocitos actuando sinérgicamente. Del mismo modo si inicialmente se hubiese producido un exceso de antígeno, los ICs que se formasen, no serían capaces de activar el complemento (la IgA sólo es capaz de activar el complemento eficientemente cuando está próxima a la zona de equivalencia) y serían indetectables por las células Raji. A su vez serían poco precipitables con PEG 3,5% y eso explicaría la bajada en los niveles de anticuerpos anti-ovalbúmina. En cualquier caso hay una recuperación posterior en los niveles de ICs de IgA, seguido de una nueva caída, quizá coincidiendo con un nuevo aporte antigénico. La tendencia a persistir en la circulación los ICs de IgA en pacientes con la enfermedad de Berger parece indicar una hiperproducción y/o una incapacidad para eliminarlos.

En dos pacientes la sobrecarga antigénica provocó la disminución de los niveles de ICs de IgA sin llegar a negativizarlos. Coincidiendo con esta bajada había una brusca subida en la afinidad de los ICs por el SC, (fig. 26) como si el porcentaje de ICs de IgA polimérica hubiese aumentado en relación al total de ICs de IgA. Dado que hay un equilibrio dinámico entre los ICs circulantes y depositados, la eliminación brusca de un determinado tipo de IC de IgA puede provocar la liberación de ICs o anticuerpos de IgA polimérica depositados en los tejidos. En este supuesto los ICs circulantes no serían totalmente representativos de los depositados.

La causa de la elevación de la IgA polimérica en los pacientes de las tres enfermedades estudiadas no está completamente elucidada. El aumento de la IgA polimérica y de los ICs circulantes pueden ocurrir secundariamente por un aclaramiento inadecuado de antígenos de origen bacteriano, vírico o alimentario o alternativamente como consecuencia de una disfunción de los linfocitos B o de la autorregulación de los linfocitos T.

Con respecto a la primera posibilidad, se han publicado en los últimos años una serie de trabajos acerca del papel central del hígado en el aclaramiento de la IgA polimérica a través del compo-

nente secretorio como receptor (57, 94, 142, 152, 158, 170 y 181). Esta forma de transporte también sirve para ICs en los que la IgA polimérica forma parte (158, 170 y 181), eliminándose antígenos procedentes del tracto intestinal de una forma rápida y eficaz. Si por cualquier causa este mecanismo falla (aporte excesivo de antígeno o de anticuerpo, destrucción de los hepatocitos, obstrucción del conducto biliar) se produce una retención de la IgA polimérica en el suero (95 y 118). Aunque todavía no se ha demostrado un mecanismo similar en el hombre, la existencia de elevados niveles de IgA monomérica y polimérica en los pacientes con la nefropatía de IgA (ver 4.1.), así como de ICs de ambos tipos (ver 4.2.), sugiere que también en humanos tiene un papel activo en el aclaramiento de la IgA.

Con respecto a la segunda posibilidad, recientemente hemos observado que la estimulación policlonal de los linfocitos de sangre periférica de pacientes con la enfermedad de Berger, induce la producción de una mayor cantidad de IgA polimérica que los controles (46). Así mismo se observó un incremento de los linfocitos T cooperadores y una falta de supresión tras la estimulación con concanavalina A, posiblemente por una falta de regulación de los linfocitos T (45 y 46). Igualmente los linfocitos de pacientes con cirrosis alcohólica tienen trastornos en la producción de inmunoglobulinas o trastornos de regulación (102 y 185). Sin embargo, el defecto en la regulación de la producción por parte de los linfocitos T no tiene necesariamente que ser la causa de la producción excesiva de IgA. Así, aunque en el lupus eritematoso diseminado se ha postulado que la deficiencia en los T supresores está relacionada con la hipergammaglobulinemia y con la formación de autoanticuerpos (108 y 171) cada vez hay mayor evidencia de la existencia de un estadio primario en el que la activación de los linfocitos B es totalmente independiente de la influencia de los linfocitos T (30, 39, 140, 141 y 187).

Recientemente se ha observado la capacidad de la IgA polimérica de influir en la expresión de los linfocitos T $\alpha$  con fenotipo de células supresoras (80). Sakai y col. (172) han encontrado que los pacientes con la nefropatía de IgA tienen un aumento de los linfocitos T $\alpha$  de naturaleza cooperadora. De confirmarse estos hallazgos, los trastornos observados en las poblaciones de linfocitos reguladores de la producción de inmunoglobulinas en esta enfermedad (28, 45, 46, 173 y 174), podrían ser explicados como un trastorno secundario a una activación policlonal de linfocitos B. Según esta explicación más que una deficiencia de influencias supresoras lo que debería existir sería una preponderancia absoluta de influencias capaces de inducir la diferenciación de muchos clones de linfocitos B a células plasmáticas productoras de IgA.

En animales de experimentación se han descrito muchos activadores policlonales inductores en una hipergammaglobulinemia (164). Determinados carbohidratos como el dextrano B 1355 o el pneumococo tipo III conjugado con DNP producen una respuesta de anticuerpos de IgA y secundariamente el depósito de la IgA y otras inmunoglobulinas en el mesangio (90). En la nefropatía de IgA primaria o secundaria es probable que haya un aporte excesivo de antígenos procedentes del intestino o de las vías respiratorias altas (5, 50 y 220) que podrían iniciar un incremento en la producción de la IgA polimérica. Esta a su vez podría inducir cambios en la inmunorregulación que aumentarían y perpetuarían la hiperproducción de IgA (185).

Los mecanismos de depósito de la IgA y su persistencia en el mesangio son desconocidos. Los resultados presentados aquí (ver sec. 4.4.4.) muestran que los agregados de IgA (A-IgA) solubles, utilizados como un modelo de ICs, son aclarados peor de la circulación sanguínea de los ratones, que los agregados de IgG (A-IgG). A priori esto podía interpretarse de varias formas. La mayor facilidad para activar el complemento de la A-IgG respecto a la A-IgA podría ser una de las razones. Sin embargo, parece ser que el aclaramiento de ICs solubles in vivo es independiente del complemento (17 y 128). Estos autores también demuestran que el tamaño de los ICs tiene un papel importante en su eliminación de la circulación, aunque ese no sea nuestro caso ya que ambos agregados tienen el mismo peso molecular. Esto sugeriría que la clase de inmunoglobulina que forma parte del agregado o IC tiene que ser crítica para su aclaramiento. En este sentido, la IgA difiere de la IgG en su contenido en carbohidratos que parecen tener una gran importancia en su eliminación, al menos en cierto tipo de ICs (196). Además, los ICs de IgA polimérica pueden eliminarse de la circulación a través de los hepatocitos por un mecanismo específico independiente de las células de Kupffer (158, 170 y 181).

La localización de la A-IgA en el hígado y en los riñones era, inicialmente, del mismo rango que la A-IgG aunque su eliminación fue más lenta. Los estudios en órganos aislados sugieren que puede deberse, al menos en parte, al menor catabolismo de la A-IgA respecto a la A-IgG. Es más, la A-IgA prácticamente no era procesada por el riñón.

Las células de Kupffer tienen un papel central en la eliminación de los ICs en los que la IgG forma parte (128, y sección 1.5.3.c.1.) y son equivalentes en muchos aspectos a los monocitos/macrófagos presentes en la circulación y en otros órganos. Por otra parte, estudios recientes han establecido que en ciertos tipos de glomerulonefritis experimentales y humanas hay infiltración de monocitos/macrófagos en el glomérulo, que pueden contribuir a mantener la integridad glomerular fagocitando las partículas depositadas, o bien perpetuar el daño inducido por la activación de diversos mecanismos inflamatorios (188). Por estas razones decidimos estudiar la unión y el catabolismo de los agregados de IgA e IgG por los macrófagos peritoneales (ver 4.4.7.). Estas células unen y catabolizan menos A-IgA que A-IgG y la adición de complemento no parece tener ningún papel en el procesamiento de la A-IgA, contrariamente a lo observado con la A-IgG o A-IgM (107 y 211), seguramente porque no tienen el tamaño suficiente para una activación efectiva del complemento.

Aunque inicialmente no se detectaron receptores para la IgA en monocitos/macrófagos (117) recientemente Fanger y col. (53) han demostrado su presencia en esas células utilizando una metodología diferente. Los datos presentados aquí están de acuerdo con la presencia de al menos una subpoblación de macrófagos con receptores para la IgA. Así, aunque la unión y catabolismo de la A-IgA es pequeño puede ser inhibido considerablemente con la adición de suero inactivado por el calor, probablemente por la presencia de IgA sérica.

La importancia de estos resultados para la comprensión de la patogenia de las glomerulonefritis mesangial de IgA es todavía especulativa, pero el hecho de que los ICs de IgG o IgA se encuentren frecuentemente en el suero de los pacientes de las tres enfermedades pero sea siempre la IgA la que esté depositada en el mesangio podría ser explicado por la mayor dificultad en la eliminación de los ICs de IgA respecto a los de IgG. Si, además, tenemos en cuenta que los linfocitos de los pacientes con la enfermedad de Berger producen dos veces más IgA polimérica que los controles, es posible imaginar que el aclaramiento de la IgA circulante estará todavía más dificultada.

Aunque se piensa que la captación hepática y la eliminación de inmunogregados es una función de las células de Kupffer (128), hay también bastante evidencia de que los hepatocitos tienen un papel en este aclaramiento. Se han descrito varios receptores en estas células, algunos ya mencionados a lo largo de la discusión: a) Receptores para el Fc de la IgG y para el factor C3 del complemento (82); b) Receptores para el Fc de la IgA (81); c) Receptor SC para la IgA polimérica (72) y d) Receptores para las asialoglicoproteínas (196).

Los resultados obtenidos inyectando i.v. agregados de IgA polimérica (A-IgAp) o monomérica (A-IgAm) (ver resultados en 4.4.4.), muestran que el aclaramiento sanguíneo de las dos proteínas puede dividirse en tres fases. En la primera el aclaramiento de la A-IgAp es más rápido que el de la A-IgAm después hay una fase intermedia en la que el aclaramiento de la A-IgAp parece saturarse alcanzando una meseta mientras que la A-IgAm sigue eliminándose rápidamente. Por último, la tercera fase (de eliminación o catabolismo) parece ser similar para ambas proteínas.

Estos resultados se correlacionaban muy bien con lo obtenido a nivel del hígado. Inicialmente la captación hepática de la A-IgAp era mayor que la de la A-IgAm pero mientras que esta última seguía eliminándose rápidamente durante todo el tiempo de la experiencia, la A-IgAp sufría un retraso de casi 1 hora antes de apreciarse alguna eliminación.

Al estudiar la unión de estas proteínas agregadas y sin agregar a hepatocitos in vitro observamos que la unión de la IgA polimérica disminuía dramáticamente por efecto de la agregación, probablemente por afectarse la unión al componente secretorio. Sin embargo, la unión al receptor para el Fc no parecía estar afectado al menos por los resultados obtenidos mediante la inhibición de la unión con IgA polimérica sin agregar y con IgG agregada.

Aunque la eliminación más lenta de la A-IgAp respecto a la misma proteína sin agregar po-



día ser explicado en base a la menor unión a los hepatocitos observada *in vitro* y por los resultados obtenidos *in vivo* con ICs de IgA polimérica por otros autores (158), resultaba sorprendente que la A-IgAm se eliminara más eficientemente que la A-IgAp. Así, la unión de esta última proteína a los hepatocitos era siempre mayor que la de la A-IgAm y no se conoce ningún mecanismo específico de eliminación para esta proteína. Sin embargo, la mayor inhibición de la captación hepática de la A-IgAm por la A-IgG respecto a la A-IgAp obtenida *in vivo* (ver resultados en 4.4.10), parece indicar que los agregados de IgA monomérica pueden ser eliminados, al menos en parte, a través de las células de Kupffer. En este sentido se ha observado que los ICs de IgM en exceso de anticuerpo son eliminados por las células de Kupffer a través de los restos de manosa (196). Al igual que la IgM, la IgA también tiene gran cantidad de restos de manosa que deben estar ocultos en estado libre pero que pueden manifestarse cuando la proteína se une al antígeno o quizá por efecto de la agregación.

Estos resultados sugieren que debe haber varios mecanismos mediante los cuales se capta la IgA por el hígado dependiendo de la presencia de polímeros y de la agregación o no. La IgA polimérica es reconocida por receptores específicos tales como el SC y el receptor para el Fc en los hepatocitos mientras que la IgA monomérica es reconocida exclusivamente a través del receptor para el Fc en los hepatocitos. La agregación de la IgA polimérica disminuye la eficacia de la unión al receptor SC en los hepatocitos mientras que la IgA monomérica agregada parece compartir mecanismos de eliminación con la IgG agregada (presumiblemente vía células de Kupffer).

Es importante destacar que la IgA polimérica (agregada o no) es captada en mayor proporción por los riñones respecto a la IgA monomérica, posiblemente porque haya otros factores que influyan en la captación, además de la cantidad y el tamaño, relacionados con las propiedades físico-químicas de la IgA polimérica como la carga neta diferente.

En los últimos años se han ido decantando una serie de propiedades biológicas de la IgA polimérica que la diferencian claramente de la IgA monomérica o de la IgA secretoria. Se ha observado que la IgA polimérica de los pacientes con cirrosis alcohólica o con mieloma de IgA inhibe la quimiotaxis de polimorfonucleares neutrófilos normales (PMNs) (208 y 209). En nuestro estudio hemos observado que el suero de los pacientes con la enfermedad de Berger inhibe la quimiotaxis o migración dirigida de PMNs normales y de acuerdo con los experimentos de adsorción de la IgA, este fenómeno parece estar relacionado con la IgA polimérica.

Se empleó suero completo en la mayoría de los experimentos debido a la propensión de la IgA a agregarse con las manipulaciones (79). Así, en un estudio reciente la inhibición de la quimiotaxis por la IgA aislada de sueros normales fue atribuida a formas de alto peso molecular, probablemente IgA agregada (104). No podemos excluir que la IgA monomérica en forma de ICs pueda ejercer un efecto similar. Sin embargo, solamente el 10-40% de los pacientes tenía ICs de IgA detectados por las células Raji o la técnica de Inh-anti IgA, mientras que la inhibición de la migración dirigida fue en el 100% de los pacientes.

No sabemos cuál es la razón por la que los PMNs de los pacientes con la nefropatía de IgA tienen una migración al azar y dirigida normales, pero se ha observado que la IgA unida a la membrana de los PMNs aislados de sangre periférica disminuye marcadamente después de varios lavados. La existencia de una actividad citotáctica elevada en el plasma fresco de estos pacientes puede ser debida a una cierta activación del complemento *in vivo* porque se han encontrado elevados niveles de C3d en el suero (113).

Estos hallazgos refuerzan el papel modulador que la IgA polimérica ejerce sobre diversos mecanismos inflamatorios (186). Así, la IgA polimérica inhibe el movimiento dirigido de neutrófilos y eosinófilos así como la actividad bactericida de neutrófilos (207, 208 y 209). También inhibe el efecto bacteriolítico mediado por el complemento de los anticuerpos IgG e IgM (44, 68 y 76) o la fagocitosis mediada por la IgG (219). La IgA polimérica elevada en el suero de los pacientes con nefropatía de IgA puede inhibir el movimiento y la fagocitosis de PMNs y/o monocitos y prolongar la presencia de ICs en la circulación, facilitando el depósito en el mesangio.

Es posible imaginar que tanto los genes del sistema HLA como otros genes que controlan fun-

ciones antígeno no específicas, así como factores ambientales, sean necesarios para que se produzca la enfermedad (7 y 14). De hecho, en algunos familiares sanos de estos pacientes se ha encontrado un incremento de los linfocitos portadores de IgA (174), un factor antinuclear que actúa en frío (147) y un aumento de los linfocitos T cooperadores respecto a los T supresores. Igualmente algunos de ellos producían in vitro gran cantidad de IgA polimérica sin ninguna manifestación clínica aparente. De forma similar en los familiares de pacientes con lupus eritematoso diseminado, enfermedad autoinmune por excelencia, se han observado anormalidades en los linfocitos T supresores sin manifestaciones clínicas (140).

Estos hechos están a favor de que hayan factores inmunogenéticos en esta entidad aunque no hay resultados unánimes respecto a la relación de los antígenos del sistema HLA con el desarrollo de la enfermedad (50). En la dermatitis herpetiformis se ha encontrado una predominancia del haplotipo HLA-B8/DRW3 (116), antígeno asociado con varias enfermedades autoinmunes y con defectos en la función de aclaramiento del sistema mononuclear fagocítico. En nuestra casuística el 40% de los pacientes tipados tenían el haplotipo DR3 (frente a un 18% de la población normal) con un riesgo relativo de 3,03 por encima de los controles (no estadísticamente significativo) (48).

Aunque todavía quedan muchos aspectos por resolver, las tres enfermedades estudiadas presentan muchas características en común. Tienen aumentada la IgA polimérica en el suero y, además, está depositada en el mesangio de la mayoría de los pacientes. Los ICs circulantes de IgA e IgG detectados en el suero tienen unas características muy similares: presencia de IgA polimérica en su composición y son de un tamaño similar.

La IgA polimérica sérica inhibe la migración dirigida de los PMNs en la enfermedad de Berger y en la cirrosis alcohólica (208) y a nivel celular los linfocitos presentan trastornos de producción y de regulación (50). Clínicamente tienen muchas manifestaciones comunes, sugiriendo mecanismos patogénéticos renales comunes y, por ello, sugerimos denominarlas como enfermedades de la IgA polimérica (47).

## 6. CONCLUSIONES.

A. En los pacientes con *cirrosis alcohólica y nefropatía de IgA* existe en el suero un aumento significativo de la concentración de IgA en las fracciones mayores que 9 S. Parte de esa IgA está en forma de inmunocomplejos (ICs) porque es fácilmente disociable a pH 2,8. La afinidad por el componente secretorio confirma la naturaleza polimérica de la IgA comprendida entre las fracciones 9-13 S.

La fácil elución a pH ácido de la IgA depositada en los riñones de pacientes con esta enfermedad, así como la disociación de la IgA recuperada al tratarla de nuevo a pH 2,8 sugiere que dicha IgA podría estar en forma de ICs. La afinidad por el componente secretorio indica que parte es IgA polimérica. Estos resultados se confirmaron al estudiar la afinidad por el componente secretorio de las biopsias renales. El 100% de los pacientes estudiados tienen IgA polimérica depositada en el mesangio glomerular. Esta IgA no parece ser un mero reflejo de la IgA sérica puesto que la proporción de IgA polimérica depositada es mayor que la IgA polimérica circulante.

En el *síndrome de Schönlein-Henoch* el 40% de los pacientes tiene la IgA polimérica sérica elevada y el 80% de las biopsias estudiadas tienen depósitos de IgA polimérica.

En la *enfermedad de Berger* la proporción de pacientes con la IgA polimérica sérica elevada es mayor que en el *síndrome de Schönlein-Henoch* (70%) observándose un porcentaje similar de biopsias con la IgA polimérica depositada.

B. La determinación de ICs de IgA se realizó por cuatro técnicas diferentes así como la de ICs de IgG por las células Raji. El porcentaje de pacientes con ICs de IgA en la *enfermedad de Berger* oscila entre un 11% con la técnica de Inh-anti IgA precipitando previamente con PEG al 3,5%; 28% por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa; 31% por las células Raji y un 36% por la técnica de Inh-anti IgA sin precipitar con PEG. El 55% de los pacientes tiene ICs de IgG.

Hay muy poca correlación entre las diferentes técnicas empleadas, lo que parece indicar que detectan ICs con propiedades inmunológicas y biológicas diferentes. La técnica que se correlaciona mejor con las restantes es la ultracentrifugación a pH 2,8. Algunos pacientes con ICs de IgA Raji o Inh-anti IgA no parecen tener simultáneamente ICs disociables a pH 2,8. Es posible que se traten de ICs con mucha afinidad por el antígeno y por tanto poco disociables o bien de IgA polimérica o agregada.

El tamaño de los ICs de IgA detectados por las células Raji es relativamente pequeño (7-13 S), siendo algo más grandes los disociables a pH 2,8 (9-17 S) y relativamente grandes los detectados por la técnica de Inh-anti IgA (> 13 S). Aunque todas las técnicas parecen capaces de detectar ICs de cualquier tamaño, sólo una pequeña parte de los ICs fueron detectados por ambas técnicas en dos pacientes con ICs de IgA Raji e Inh-anti IgA.

Había una buena correlación entre los ICs de IgA Raji y la presencia de hematuria y el aumento de la IgA polimérica. Esos ICs son los únicos que disminuyen con el tratamiento con difenilhidantoina. Posiblemente los ICs más adecuados para el seguimiento de la enfermedad son aquellos que tienen un tamaño pequeño, han activado el complemento y son poco precipitables (debido a la poca afinidad por el antígeno o porque se trate de IgA polimérica activadora del complemento sin la presencia del antígeno).

En la *nefropatía de IgA secundaria a una cirrosis alcohólica* (CA) hay un porcentaje de pacientes ligeramente mayor con ICs de IgA Raji que en la enfermedad de Berger (43% CA vs 31% Berger) y Raji IgG (66,6% vs 55% Berger), mientras que el 100% de los pacientes estudiados tienen ICs Inh-anti IgA sin PEG, frente a un 36% en los Berger. También hay mayor proporción de pacientes con ICs disociables a pH 2,8 (67% CA vs 28% Berger). Los ICs detectados por ultracentrifugación a pH 2,8 en los sueros de pacientes con *cirrosis alcohólica y nefropatía de IgA* y los ICs depositados en el mesangio tienen el mismo tamaño (alrededor de 9-13 S).

Hemos puesto a punto, por primera vez en la literatura, un nuevo método para detectar in-

munocomplejos de IgA polimérica basado en la fijación de esa inmunoglobulina por el componente secretorio. Previamente es necesario eliminar la IgM por inmunoabsorción para evitar falsos positivos; a continuación se determinaron los ICs por el método de las células Raji y, posteriormente, se añadió el componente secretorio marcado con  $^{125}$ I. Con esta técnica hemos mostrado que aproximadamente el 33% de los pacientes con la *enfermedad de Berger* e ICs de IgA Raji presentan ICs de IgA polimérica, mientras que los pacientes con *cirrosis alcohólica y nefropatía de IgA* los tienen en un 66%.

Hemos comprobado que en los individuos normales los ICs de IgA polimérica desaparecen rápidamente de la circulación tras la ingesta de una dieta hiperproteica. La persistencia de los mismos en pacientes con la nefropatía de IgA, parece indicar un defecto en el aclaramiento de este tipo de ICs o una hiperproducción por un estímulo antigénico exagerado. El perfil de los ICs de IgA obtenidos tras la dieta hiperproteica se corresponde con el perfil de los anticuerpos anti-ovoalbúmina tanto en los controles como en los pacientes, indicando que la producción de ICs de IgA es un mecanismo fisiológico normal de eliminación de antígenos alimentarios. Además, estos datos sugieren que parte de los ICs de IgA Raji detectados en los pacientes con la enfermedad de Berger están formados con anticuerpos contra esos antígenos.

C. El plasma de los pacientes con la *enfermedad de Berger* inhibe la migración dirigida de los polimorfonucleares neutrófilos normales. Esta inhibición está fuertemente ligada a la IgA polimérica y en menor medida a los ICs de IgA. Estos resultados son importantes por dos razones. La inhibición de la quimiotaxis o movimiento dirigido de los PMNs impide que estos realicen eficientemente la fagocitosis de ICs potencialmente patogénicos. Igualmente la IgA polimérica podría afectar a la quimiotaxis de monocitos/macrófagos y disminuir globalmente la capacidad fagocitaria del sistema mononuclear fagocítico. En segundo lugar se refuerza el papel modulador de la IgA polimérica sobre diversas respuestas inflamatorias mediadas por otras inmunoglobulinas o incluso por su acción directa.

D. El aclaramiento sanguíneo de los agregados de IgA (A-IgA), inyectados i.v. a ratones, es más lento que el de los agregados de IgG (A-IgG). La captación, eliminación y/o catabolismo de la A-IgG por el hígado es mayor que el de la A-IgA. En los riñones la captación inicial es similar aunque la A-IgA sigue captándose a tiempos en los cuales la A-IgG ya ha empezado a eliminarse, posiblemente porque todavía queda A-IgA en el plasma susceptible de depositarse.

Este comportamiento se confirmó mediante estudios invitro del catabolismo de cortes de hígado y riñón. El catabolismo hepático de la A-IgG es significativamente más alto que el de la A-IgA. El catabolismo renal es también superior para la A-IgG siendo prácticamente nulo para la A-IgA. Igualmente la unión y el catabolismo de la A-IgG por los macrófagos peritoneales es mayor que el de la A-IgA. La adición de complemento aumenta la unión de la A-IgG sin afectar a su catabolismo, mientras que la A-IgA incluso se une peor, probablemente por la inhibición competitiva de la IgA sérica.

Los resultados obtenidos con los agregados de IgA ó IgG podrían resumirse en que el menor aclaramiento sanguíneo de la A-IgA respecto a la A-IgG y el mayor depósito renal son una consecuencia de un peor manejo de la A-IgA por el sistema mononuclear fagocítico.

El aclaramiento sanguíneo inicial de los agregados de IgA polimérica agregada es más rápido que el de la IgA monomérica agregada o que el de las mismas proteínas sin agregar. Sin embargo se observa una saturación más rápida de este aclaramiento que tiene por consecuencia una eliminación y/o catabolismo más lento.

La captación hepática inicial de la IgA polimérica y monomérica agregadas es similar, aunque la eliminación y/o catabolismo posterior es menor para la IgA polimérica agregada. La captación renal de la IgA polimérica agregada o sin agregar es mayor que la de la IgA monomérica tratada en las mismas condiciones.

La inyección previa de un exceso de IgG agregada no inhibe la captación hepática de la IgA monomérica o polimérica sin agregar. Sin embargo inhibe parcialmente la captación de las mismas proteínas agregadas sobre todo la de la IgA monomérica, sugiriendo mecanismos comunes de eliminación, quizá a través de las células de Kupffer.

La unión de la IgA polimérica a los hepatocitos a través del componente secretorio disminuye por efecto de la agregación. La unión a los hepatocitos de la IgA polimérica y monomérica parece realizarse por mecanismos diferentes dado que no hay una inhibición cruzada de la unión.

En conjunto parece que la captación hepática inicial de la IgA polimérica aumenta por efecto de la agregación, pero hay una disminución de su tasa de eliminación y/o catabolismo, que puede ser explicado en parte por su menor capacidad de unión a los hepatocitos. Esto conduce a un aclaramiento sanguíneo más lento que posibilita un depósito mayor en el glomérulo renal, posiblemente facilitado por las características inmunoquímicas propias de la IgA polimérica, tales como su mayor carga electronegativa neta respecto a la IgA monomérica.

*En resumen*, la IgA polimérica se encuentra elevada en el suero de los pacientes con la enfermedad de Berger, síndrome de Schönlein-Henoch y en la nefropatía de IgA secundaria a una cirrosis alcohólica. Igualmente la IgA polimérica está depositada en el mesangio glomerular de la mayoría de los pacientes de las tres enfermedades. La presencia de inmunocomplejos de IgA e IgG con características comunes, la inhibición de la quimiotaxis provocada por la IgA polimérica de pacientes con la enfermedad de Berger o con cirrosis alcohólica, así como el peor manejo de los agregados de IgA respecto a los de IgG por el sistema mononuclear fagocítico, sugieren un trastorno en el aclaramiento de la IgA polimérica y/o de los ICs de IgA e IgG, posiblemente inducido o perpetuado por la IgA polimérica, que puede ser clave en el depósito de esos ICs en el mesangio glomerular. Todos estos hechos sugieren la existencia de mecanismos patogénicos glomerulares comunes ligados a la IgA polimérica, por lo que sugerimos un nuevo término para denominar estas enfermedades: *Nefropatías de la IgA polimérica*.

## 7. BIBLIOGRAFIA.

- 1.— Amzel LM., Poljak RJ. Three dimensional structure of immunoglobulins. *Ann. Rev. Biochem.* 48, 961, 1979.
- 2.— André F., André G. Participation de l'immunoglobuline A monomérique et dimérique à l'hypergammaglobulinémie de la cirrhose éthylique. *Biol. Gastroenterol (Paris)*. 9, 147, 1976.
- 3.— André C., Berthoux FC., André F., Gillon J., Gonin C., Sabatier J Ch. Prevalence of IgA2 deposits in IgA nephropathies: a clue to their pathogenesis. *N. Engl. J. Med.* 303, 1.343, 1980.
- 4.— André C., Heremans JF., Vaerman JP., Cambiaso CA. A mechanism for the induction of immunological tolerance by antigen feeding: antigen antibody complexes. *J. exp. Med.* 142, 1.509, 1975.
- 5.— André F., Druguet M., André C. Effect of food in circulating antigen-antibody complexes in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Digestion*. 17, 554, 1978.
- 6.— Baliah T., Kim KH., Anthone S., Anthone R., Montes M., Andrés GA. Recurrence of Henoch-Schönlein purpura glomerulonephritis in transplanted kidneys. *Transplantation*. 18, 343, 1974.
- 7.— Benacerraf B. Genetic control of the specificity of T lymphocytes and their regulatory products. pp. 419-431, en: *Immunology 80. Progress in Immunology IV*. Ed: Fougerau M., Dausset J. Academic Press, London 1980.
- 8.— Bene J., Faure G., Duheille J. Dimeric structure of IgA in mesangial deposits in Berger's disease. *Kidney int.* 20, 426, 1981. Abstr.
- 9.— Berger J. IgA glomerular deposits in renal disease. *Transplant. Proc.* 1, 939, 1969.
- 10.— Berger J., Yaneva H., Nabarra B. Glomerular changes in patients with cirrhosis of the liver *Adv. Nephrol.* 7, 3, 1978.
- 11.— Berger J., Yaneva H., Nabarra B., Barbanel C. Recurrence of mesangial deposition of IgA after renal transplantation. *Kidney int.* 7, 232, 1975.
- 12.— Berger SR, Helms RA., Bull DM, Cirrhotic hyperglobulinemia. Increased rates of immunoglobulin synthesis by circulating lymphoid cells. *Dig. Dis. Sci.* 24, 741, 1979.
- 13.— Berthoux FC., Gagne A., Sabatier JC., Durret F., Le Petit JC., Marcelin M., Mercier M., Brizard CP. HLA-Bw 35 and mesangial IgA glomerulonephritis. *N. Engl. J. Med.* 298, 1.034, 1978.
- 14.— Biozzi G., Siqueira M., Stiffel C., Ibáñez Om., Mouton D., Ferreira VCA. Genetic selections for relevant immunological functions, pp. 432-457, en: *Immunology 80. Progress in Immunology IV*. Ed. por Fougerau M., Dausset J. Academic Press, London, 1980.
- 15.— Birbeck MSC., Cartwright P., Hall JG., Orlans E., Pepaard J. The transport by hepatocytes of immunoglobulin A from blood to bile visualized by autoradiography and electron microscopy. *Immunology*, 37, 477, 1979.
- 16.— Boackle RJ., Pruitt KM., Mestecky J. The interactions of human complement with interfacially aggregated preparation of human secretory IgA. *Immunochemistry*. 41, 543, 1974.
- 17.— Bockow B., Mannik M. Clearance and tissue uptake of immune complexes in complement-depleted and control mice. *Immunology*. 42, 497, 1981.
- 18.— Border WA. Immune complex detection in glomerular diseases. *Nephron*. 24, 105, 1979.
- 19.— Boyden S. The chemotactic effect of mixture of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J. exp. Med.* 15, 453, 1962.
- 20.— Brandtzaeg P. Characteristics of SC-Ig complexes formed in vitro. *Adv. Expo. Med. Biol.* 45, 87, 1974.
- 21.— Brandtzaeg P. Transport models for secretory IgA and secretory IgM. *Clin. exp. Immunol.* 44, 221, 1981.
- 22.— Bull DM., Bienenstock J., Tomasi TB. Studies on human intestinal immunoglobulin A. *Gastroenterology*. 60, 370, 1971.
- 23.— Burrit MF., Calvanico NJ., Mehta S., Tomasi TB. Activation of the classical complement pathway by Fc fragment of human IgA. *J. Immunol.* 118, 723, 1977.
- 24.— Butler JE., Peterson L., McGivern PL. A reliable method for the preparation of bovine secretory immunoglobulin A (S-IgA) which circumvents problems posed by IgG1 dimers in colostrum. *Mol. Immunol.* 17, 757, 1980.
- 25.— Callard P., Feldman G., Prandi D., Behr MF., Mandet C., Weiss Y., Druet P., Benhamou JP., Bariety J. Immune complex type glomerulonephritis in cirrhosis of liver. *Am. J. Pathol.* 80, 329, 1975.
- 26.— Cardella C., Davies P., Allison AC. Immune complexes induce selective release of lysosomal hydrolases from macrophages. *Nature*. 247, 46, 1974.

- 27.— Castaño JG., Alemany S., Nieto A., Mato JM. Activation of phospholipid methyl transferase by glucagon in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 255, 9.041, 1980.
- 28.— Chatenoud L., Bach MA. Abnormalities of T-cell subsets in glomerulonephritis and systemic lupus erythematosus. *Kidney int.* 20, 267, 1981.
- 29.— Clarkson AR., Seymour AE., Thompson AJ., Haynes WDG, Chan YL Jackson B. IgA nephropathy: a syndrome of uniform morphology diverse features and uncertain prognosis. *Clin. Nephrol.* 8, 459, 1977.
- 30.— Cohen PL, Ligler FS., Ziff M., Vitetta ES. Increase ratio of surface IgA on spleen cells from NZB mice. *Arthritis Rheum.* 21, 551, 1978. Abstr.
- 31.— Cohen S. The requirement for the association of two adjacent rabbit  $\gamma$ G-antibody molecules in the fixation of complement by immune complexes. *J. Immunol.* 100, 409, 1968.
- 32.— Colten HR., Bienenstock J. Lack of C3 activation through classical or alternate pathways by human secretory IgA anti-blood group A antibody. *Adv. Exp. Med. Biol.* 45, 305, 1974.
- 33.— Conley ME., Cooper MD., Michael AF. Selective deposition of immunoglobulin A1 in immunoglobulin A nephropathy, anaphylactoid purpura nephritis and systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 66, 1.432, 1980.
- 34.— Coppo R., De Marchi AO., Carbonara AO., Bulozomi MR., Basolo B., Roccatello D., Segoloni G., Messina M., Giachino F., Piccoli G. IgA, IgG, IgM circulating immune complexes in Berger and Schönlein-Henoch glomerulonephritis. Abstr. IM-007, p. 126, 8th Int. Congr. Nephrol. Athens, 1981.
- 35.— Cordonier D., Vialtel P., Chenais F., Gros Lambert P., Boragmet MC., Martin H. Augmentation du taux des IgA sériques dans les glomerulonephrites avec dépôts d'IgA dans le mesangium. *Nouv. Press. Med.* 35, 2.264, 1974.
- 36.— Couser WC., Steinmuller DR., Stilmant MM., Salant DJ., Lowenstein LM. Experimental glomerulonephritis in the isolated perfused rat kidney. *J. Clin. Invest.* 62, 1.275, 1978.
- 37.— Creighton V., Lambert PH., Miescher PA. Detection of antibodies and soluble antigen antibody complexes by precipitation with polyethylene glycol. *J. Immunol.* 111, 1.219, 1973.
- 38.— Day JF., Thornburg RW., Thorpe SR., Baynes JW. Carbohydrate mediated clearance of antibody-antigen complexes from the circulation. The role of high mannose oligosaccharides in the hepatic uptake of IgM antigen complexes. *J. Biol. Chem.* 255, 2.360, 1980.
- 39.— De la Concha EG., Oldham G., Webster ADB., Asherom GL., Platt-Mills TAE. Quantitative measurement of T and B cell functions in "variable" primary hypogammaglobulinemia: Evidence for a consistent B cell defect. *Clin. exp. Immunol.* 27, 208, 1977.
- 40.— Digeon M., Lauer M., Riza J., Bach JF. Detection of circulating immune complexes in human sera by symplified assays with polyethylene glycol. *J. Immunol. Meth.* 16, 165, 1977.
- 41.— Doi T., Kanatsu K., Sekika K., Yoshida H., Nagai H., Fuzioka A., Hamazima Y. Detection of circulating immune complexes (CIC) of IgG, IgM and IgA classes in various glomerular diseases. Abstr. IM-008, p. 126, 8th Int. Congr. Nephrol. Athens, 1981.
- 42.— Dorrington KJ., Painter RH. Functional differentiation of Immunoglobulin G. pp. 77-82. Vol. 26. En: *Proteins and Biological Fluids*. Ed. H. Peeters, Brussels, Belgium, 1978.
- 43.— Droz D. Natural history of primary glomerulonephritis with mesangial deposits of IgA. *Contrib. Nephrol.* 2, 150, 1976.
- 44.— Eddie DS., Schulkind ML., Robbins JB. The isolation and biologic activities of purified secretory IgA and IgG anti-Salmonella typhimurium "O" antibodies from rabbit intestinal fluid and colostrum. *J. Immunol.* 106, 181, 1971.
- 45.— Egidio J., Blasco R., Sancho J., Lozano L., Hernando L., T-cell abnormalities in IgA nephropathy: prevalence of T helper subset and impaired IgA-specific T cell activity. (mandado a publicar).
- 46.— Egidio J., Blasco R., Sancho J., Lozano L., Sánchez-Crespo M., Hernando L. Increased rates of polymeric IgA synthesis by circulating lymphoid cells in IgA mesangial glomerulonephritis. *Clin. exp. Immunol.* 47, 309, 1982.
- 47.— Egidio J., López Trascasa M., Mampaso F., Sancho J., Hernando L. Polymeric IgA glomerulonephritis. 4th Int. Congr. Immunol. Paris July 1980. Abstr. 18.5.09.
- 48.— Egidio J., Rivera F., Sancho J., Moreno M., Kreisler M., Hernando L. Estudio del sistema HLA y factores de riesgo para la insuficiencia renal en la glomerulonefritis mesangial IgA. *Nefrología*, 1, 21, 1981.
- 49.— Egidio J., Sánchez Crespo M., Sancho J., Hernando L. Phenytoin in the treatment of IgA mesangial glome-

- lulonephritis. Berger's disease. Clin. Nephrol. 15, 164, 1981.
- 50.— Egidio J., Sancho J., Blasco R., Rivera F., Hernando L. Immunopathogenetic aspects of IgA nephropathy. En: Adv. Nephrol. vol 11. Ed. Hamburger, Crosnier, Grünfeld. Maxwell eds. Year Book, Chicago 1982.
  - 51.— Egidio J., Sancho J., López Trascasa M., Sánchez Crespo M., Rivera F., Alvarez V., Barat P., Hernando L. New therapeutic approach to IgA mesangial glomerulonephritis (Berger's disease). pp. 195-206. Vol. 9. En: Advances in Nephrourology. New York, 1981. Plenum Press. Ed.: Pavone-Macaluso M., Smith PH.
  - 52.— Emlen W., Mannik M. Kinetic and mechanisms for removal of circulating single-stranded DNA in mice. J. exp. Med. 147, 684, 1978.
  - 53.— Fanger MW., Shen L., Pugh J., Bernier GM. Subpopulations of human peripheral granulocytes and monocytes express receptors for IgA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77, 3.640, 1980.
  - 54.— Finbloom DS., Magilavy DB., Harford JB., Rifai A., Plotz PH. Influence of antigen on immune complex behaviour in mice. J. Clin. Invest. 68, 214, 1981.
  - 55.— Finbloom DS., Abeles D., Rifai A., Plotz PH. The specificity of uptake of model immune complexes and other protein aggregates by the murine reticuloendothelial system. J. Immunol. 125, 1.060, 1980.
  - 56.— Finbloom DS., Plotz PH. Studies of reticuloendothelial function in the mouse with model immune complexes. II. Serum clearance, tissue uptake, and reticuloendothelial saturation in NZB/Q mice. J. Immunol. 123, 1.600, 1979.
  - 57.— Fisher MM., Nagy B., Bazin H., Underdown BJ. Biliary transport of IgA: role of secretory component. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, 2.008, 1979.
  - 58.— Frank MM., Schreiber AD., Atkinson JP., Jaffe J. Pathophysiology of immune hemolytic anemia. Ann. Int. Med. 87, 210, 1977.
  - 59.— García Fuentes M., Chantler C., Williams DG., Cryoglobulinaemia in Henoch-Schönlein purpura. Brit. Med. J. 2, 163, 1977.
  - 60.— García Pardo A., Lamm ME, Plaut AG., Frangione B. Secretory component is covalently bound to a single sub-unit in human secretory IgA. Mol. Immunol. 16, 477, 1979.
  - 61.— Gallin JJ., Clark RA., Frank MM. Kinetic analysis of chemotactic factor generation in human serum via activation of the classical and alternate complement pathways. Clin. Immunol. Immunopathol. 3, 334, 1975.
  - 62.— Gavrilova EM., Egorov AM., Shakkaniya KL. Isolation and immunochemical study of monomeric and dimeric forms of human IgA globulins. Biochemistry. 41, 684, 1976.
  - 63.— Germuth FG Jr., Rodríguez E. Immunopathology of the renal glomerulus. pp. 25-42, 1973. Boston. Little Brown & Co.
  - 64.— Gluckman JC., Jacob N., Beaufils H., Baumelau A., Sala H., German A., Legrain M. Clinical significance of circulating immune complexes: detection in chronic glomerulonephritis. Nephron. 22, 138, 1978.
  - 65.— Gormly AA., Smith PS., Seymour AE., Clarkson AR., Woodroffe AJ. IgA glomerular deposits in experimental cirrhosis. Am. J. Pathol. 104, 50, 1981.
  - 66.— Götze O., Müller-Eberhard HJ. The C3 activator system: an alternate pathway of complement activation. J. exp. Med. (suppl). 134, 90 s, 1971.
  - 67.— Grabar P., Williams CA. Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immuno-chimiques d'un mélange de protéines. Application au serum sanguin. Biochim, biophys. Acta. 10, 193, 1953.
  - 68.— Griffiths JM. Bactericidal activity of meningococcal antisera. J. Immunol. 114, 1.779, 1975.
  - 69.— Gunewardena P., Cooke KB. 1,4-dithiothreitol as a reagent for the reductive degradation of human  $\gamma$ G globulin. Biochem. J. 99, 8 p, 1966.
  - 70.— Guyer RL., Koshland ME., Knopf PM. Immunoglobulin binding by mouse intestinal epithelial cell receptors. J. Immunol. 117, 587, 1976.
  - 71.— Haakenstad AO., Case JB., Mannik M. Effect of cortisone on the disappearance kinetics and tissue localization of soluble immune complexes. J. Immunol. 114, 1.153, 1975.
  - 72.— Hall JG., Andrew E. Biliglobulin. A new look at IgA. Immunology today. 1, 100, 1980.
  - 73.— Hall JG., Gyure LA., Payne AWR. Comparative aspects of the transport of immunoglobulin A from blood to bile. Immunology. 41, 899, 1980.
  - 74.— Hall RP., Lawley TJ., Heck JA., Katz SI. IgA-containing immune complexes in dermatitis herpetiformis, Henoch-Schönlein purpura, systemic lupus erythematosus and other diseases. Clin. exp. Immunol. 40, 431, 1980.



- 75.— Hall RP., Stachura I., Whiteside TL., Lawley TJ. IgA containing circulating immune complexes in IgA nephropathy. Clin. Res. 29, 465 A, 1981. Abstr.
- 76.— Hall WH., Mannion RE., Zimmerman HH. Blocking serum lysis of *Brucella abortus* by hyperimmune rabbit immunoglobulin A. J. Immunol. 107, 41, 1971.
- 77.— Hebert LA., Allhuser C., Koethe S. Some hemodynamic determinants of immune complex trapping by the kidney. Kidney int. 14, 452, 1978.
- 78.— Henson PM., Johnson HB., Spiegelberg HL. The release of granule enzymes from human neutrophils stimulated by aggregated immunoglobulins of different classes and sub-classes. J. Immunol. 109, 1.182, 1972.
- 79.— Heremans JF. Immunoglobulin A. Cap. 6, pp. 365-522, en: The Antigens. Vol. 2. Ed.: M. Sela. Academic Press, New York, 1974.
- 80.— Hoover RG., Dieckgraefe BK., Lynch RG. T cells with Fc receptors for IgA: induction of T cells in vivo and in vitro by purified IgA. J. Immunol. 127, 1.560, 1981.
- 81.— Hopf U., Brandtzaeg P., Hutteroh TH., Meyer zum Büschenfelde KH. In vivo and in vitro binding of IgA to the plasma membranes of hepatocytes. Scand. J. Immunol. 8, 543, 1978.
- 82.— Hopf U., Meyer zum Büschenfelde KH., Dierich MP. Demonstration of binding sites for IgG Fc and the third complement component (C3) on isolated hepatocytes. J. Immunol. 117, 639, 1976.
- 83.— Hopf U., Schaefer HE., Hess G., Meyer zum Büschenfelde KH. In vivo uptake of immune complexes by parenchymal and nonparenchymal liver cells in mice. Gastroenterology, 80, 250, 1981.
- 84.— Hubbard AL., Cohn ZA. The enzymatic iodination of the red cell membrane. J. Cell Biol. 55, 390, 1972.
- 85.— Hubbard AL., Cohn ZA. Externally disposed plasma membrane proteins. I. Enzymatic iodination of mouse L-cells. J. Cell. Biol. 64, 438, 1975.
- 86.— Hunter WM., Greenwood FC. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature, Lond. 194, 495, 1962.
- 87.— Hyslop NE., Dourmashkin RR., Green NM., Porter RR. The fixation of complement and the activated first component (C1) of complement by complexes formed between antibody and divalent hapten. J. exp. Med. 131, 783, 1970.
- 88.— Iida K., Fujita T., Inai S., Sasaki M., Kato T., Kosayashi K. Complement fixing abilities of IgA myeloma proteins and their fragments: the activation of complement through the classical pathway. Immunochemistry. 13, 747, 1976.
- 89.— Iida H., Tomosugi N., Kida H., Mizumura Y., Sugimoto T. Circulating IgA immune complexes in patients with renal disease. Abstr. CN-065, p258, 8th Int. Congr. Nephrol. Athens, 1981.
- 90.— Isaacs K., Miller F., Lane B. Experimental model for IgA nephropathy. Clin. Immunol. Immunopathol. 20, 419, 1981.
- 91.— Ito S., Mikawa H., Shinomiya K., Yoshida T. Suppressive effect of IgA soluble immune complexes on neutrophil chemotaxis. Clin. exp. Immunol. 37, 436, 1979.
- 92.— Iturriaga H., Pereda T., Estévez A., Ugarte G., Serum immunoglobulin A changes in alcoholic patients. Ann. Clin. Res. 9, 39, 1977.
- 93.— Izui S., Lambert PH., Miescher PA. In vitro demonstration of a particular affinity of glomerular basement membrane and collagen for DNA: a possible basis for a local formation of DNA-anti DNA complexes in systemic lupus erythematosus. J. exp. Med. 144, 428, 1976.
- 94.— Jackson GDF., Lemaitre-Coelho I., Vaerman JP. Transfer of MOPC-315 IgA to secretions in MOPC-315 tumour bearing and normal BALB/c mice. Prot. Biol. Fluids. Proc. Colloq. 25, 99, 1977.
- 95.— Kaartinen M. Liver damage in mice and rats causes tenfold increase of blood immunoglobulin A. Scand. J. Immunol. 7, 519, 1978.
- 96.— Kaartinen M., Hurme M., Makela O. Evidence for oligomeric IgA production by peripheral rat lymph nodes. Nature. 252, 329, 1974.
- 97.— Kaplan ME., Dalmaso AP., Woodson M. Complement-dependent opsonization of incompatible erythrocytes by human secretory IgA. J. Immunol. 108, 275, 1972.
- 98.— Kater L., Adriaan C., Baart de la Faille-Kuyper EH., Vogten AJM., Grijm R. Alcoholic hepatic disease. Specificity of IgA deposits in liver. Am. J. Clin. Pathol. 71, 51, 1979.
- 99.— Kauffmann RH., Herrmann WA., Meyer CJLM., Daha MR., Van Es LA. Circulating IgA immune complexes in Henoch Schönlein purpura. Am. J. Med. 69, 859, 1980.
- 100.— Kauffmann RH., Van Es LA., Daha MR. The specific detection of IgA in immune complexes. J. Immunol. Meth. 40, 117, 1981.

- 101.— Kaufman RL., Hoets JC., Quismorio FP., Tong M. Circulating immune complexes in patients with alcoholic liver disease. *Clin. Res.* 27, 38 A, 1979. (Abstr.)
- 102.— Kawanishi H., Tavassolie H., Mac Dermott RP., Shaegren JM. Impaired concanavalin A-inducible suppressor T-cell activity in active alcoholic liver disease. *Gastroenterology*, 80, 510, 1981.
- 103.— Keller HU., Hess MW., Cottier H. Inhibiting effects of human plasma and serum on neutrophil random migration and chemotaxis. *Blood*. 44, 843, 1974.
- 104.— Kemp AS., Gripps AW., Brown S. Suppression of leukocyte chemokinesis and chemotaxis by human IgA. *Clin. exp. Immunol.* 40, 388, 1980.
- 105.— Kemp AS., Roberts-Thompson P., Brown S. Inhibition of human neutrophil migration by aggregated gamma-maglobulin. *Clin. exp. Immunol.* 36, 334, 1979.
- 106.— Kijlstra A., Van der Leij A., Knutson DW., Fleuren GJ., Van Es LA. The influence of phagocyte function on glomerular localization of aggregates IgM in rats. *Clin. exp. Immunol.* 32, 207, 1978.
- 107.— Kijlstra A., Van Es LA., Daha MR. The role of complement in the binding and degradation of immunoglobulin aggregates by macrophages. *J. Immunol.* 123, 2.488, 1979.
- 108.— Klassen LW., Krakauer RS., Steinberg AD. Selective loss of suppressor cell function in New Zealand mice induced by NTA. *J. Immunol.* 119, 830, 1977.
- 109.— Knutson DW. Immunochemistry of soluble immune complexes. pp. 430-2. En: Barnet EV, moderator. Circulating immune complexes: their immunochemistry, detection, and importance. *Ann. Intern. Med.* 91, 430, 1979.
- 110.— Knutson DW., Urederoe DL., Aoki KR., Hays EJ., Levy L. Cadmium and the reticuloendothelial system. *Immunology*. 40, 17, 1980.
- 111.— Koistinen J., Fudenberg HH. Antibodies to allotypes, with special reference to the allotypes of immunoglobulin A. pp. 562-569, en: *Manual of Clinical Immunology*. Ed. Rose NR., Friedman H. American Society for Microbiology. Washington DC, 1976.
- 112.— Kutteh W., Koopman WJ., Conley ME., Egan ML., Mestecky J. Production of predominantly polymeric IgA by human peripheral blood lymphocytes stimulated in vitro with mitogens. *J. exp. Med.* 152, 1.424, 1980.
- 113.— Lagrue G., Branallec A., Intrator L., Moisy M., Sobel A. Evaluation du C3d dans les néphropathies glomérulaires chroniques primitives. *Nouv. Presse. Med.* 8, 1153, 1979.
- 114.— Lagrue G., Hirbec G., Fournel M., Intrator L. Glomerulonephrites à dépôts d'IgA. Etude des IgA sériques. *J. Urol. Néphrol.* 80, 385, 1974.
- 115.— Lambert PH., Dixon FJ., Zubler RH., Agnello V., Cambiaso C., Casali C., Clarke J., Cowdery JS., McDuffies FC., Hay FC., Mac Lennan ICM., Masson P., Müller-Eberhard HJ., Penttinen K., Smith M., Tappernier G., Theofilopoulos AN., Verroust P. A WHO collaborative study for the evaluation of eighteen methods for detecting immune complexes in serum. *J. clin. Lab. Immunol.* 1, 1, 1978.
- 116.— Lawley TJ., Hall RP., Fauci AS., Katz SI., Hamburger ML., Frank MM. Defective Fc-receptor functions associated with the HLA-B8/DRW3 haplotype. *N. Engl. J. Med.* 104, 185, 1981.
- 117.— Lawrence DA., Weigle WO., Spiegelberg HL. Immunoglobulins cytophilic for human lymphocytes, monocytes and neutrophils. *J. Clin. Invest.* 55, 368, 1975.
- 118.— Le maître-Coelho J.M. Jackson GDF., Vaerman JP. High levels of secretory component in the serum of rats with bile duct obstruction. *J. exp. Med.* 147, 934, 1978.
- 119.— Levinsky RJ., Barrat JM. IgA immune complexes in Henoch-Schönlein purpura. *Lancet* 2, 1100, 1979.
- 120.— López Trascasa, M. Evidencia de altos niveles de IgA polimérica en el suero de pacientes con GN mesangial con depósitos de IgA (Enfermedad de Berger). Tesis Doctoral, Mayo 1979. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense. Madrid.
- 121.— López Trascasa M., Egido J., Sancho J., Hernando L. IgA glomerulonephritis (Berger's disease): evidence of high serum levels of polymeric IgA. *Clin. exp. Immunol.* 42, 247, 1980.
- 122.— Lowance D., Mullins JD., Mc Phaul JJ. Jr. Immunoglobulin A (IgA) associated glomerulonephritis. *Kidney int.* 3, 167, 1973.
- 123.— Lowry O., Rosebrough NS., Farr AL., Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 142, 265, 1951.
- 124.— Lum LG., Muchmore AV., Keren D., Decker J., Koski I., Strober W., Blaese RM. A receptor for IgA on human T lymphocytes. *J. Immunol.* 122, 65, 1979.

- 125.— Lum LG., Muchmore AV., O'Connor N., Strober W., Blaese RM. Fc receptors for IgA on human B, and human non-B non-T lymphocytes. *J. Immunol.* 123, 714, 1979.
- 126.— Magilavy DR., Rifai A., Plotz PH. An abnormality of immune complex kinetics in murine lupus. *J. Immunol.* 126, 770, 1981.
- 127.— Mancini G., Carbonara OA., Heremans JF. Immunological quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry.* 2, 235, 1965.
- 128.— Mannik M. Physicochemical functional relationships of immune complexes. *J. Invest. Dermatol.* 74, 333, 1980.
- 129.— Mauer SM., Fish AJ., Blau EB., Michael AF. The glomerular mesangium. I. Kinetic studies of macromolecular uptake in normal and nephrotic rats. *J. Clin. Invest.* 51, 1092, 1972.
- 130.— Mauer SM., Fish AJ., Day N., Michael AF. The glomerular mesangium. II. Studies of macromolecular uptake on nephrotoxic nephritis in rats. *J. Clin. Invest.* 53, 431, 1974.
- 131.— Mauer SM., Sutherland DER., Howard RJ., Fish AJ., Najarian JS., Michael AF. The glomerular mesangium. III. Acute immune mesangial injury: a new model of glomerulonephritis. *J. exp. Med.* 137, 553, 1973.
- 132.— Mc Conahey P.J., Dixon FJ. A method of trace iodination of proteins for immunologic studies. *Int. Arch. Allergy.* 29, 185, 1966.
- 133.— Mc Connel I., Munro A., Waldmann H. The immune system. A course of the molecular and cellular basis of immunity. Ed. por Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1981.
- 134.— Mc Coy RD., Abramowsky CR., Tisher CL. IgA nephropathy. *Am. J. Pathol.* 76, 123, 1974.
- 135.— Mc Donald IM., Dumble LJ., Kincaid-Smith PS. The association of HLA-Bw35 and circulating immune complexes in patients with IgA nephropathy. IV. *Int. Congr. Immunol. Paris. 1980. Abstr.* 8.5.36.
- 136.— Mestecky J., McGhee JR., Crago SS., Jackson S., Kilian M., Kiyono H., Babb JL., Michalek SM. Molecular-Cellular interactions in the secretory IgA response. *J. Reticuloendothel. Soc.* 28, 455, 1980.
- 137.— Michael A., Nevins T., Raji L., Keane W., Scheinman J. Macromolecular transport in the glomerulus: studies of the mesangium and epithelium in vivo and in vitro. En: *Contemporary Issues in Nephrology.* Ed. por Brenner B., Stein J., New York, Churchill Livingstone, 1979.
- 138.— Michael AF., Keane WF., Raji L., Vernier RL., Mauer SM. The glomerular mesangium. *Kidney Int.* 17, 141, 1980.
- 139.— Miller GW. Solubilization of IgA immune precipitates by complement. *J. Immunol.* 117, 1374, 1976.
- 140.— Miller KB., Schwartz RS. Familial abnormalities of suppressor cell function in systemic lupus erythematosus. *N. engl. J. Med.* 301, 803, 1979.
- 141.— Moutsopoulos HM., Boelhm-Truitt M., Kassan SS., Chused TM. Demonstration of activation of B-lymphocytes in New Zealand black mice at birth by an immunoradiometric assay for murine IgM. *J. Immunol.* 119, 1639, 1977.
- 142.— Mullock BM., Hinton RH., Dobrota M., Peppard JV., Orlans E. Endocytic vesicles in liver carry polymeric IgA from serum to bile. *Biochim. biophys. Acta.* 587, 381, 1979.
- 143.— Nakamoto Y., Asano V., Dohi K., Fujioka KM., Iida H., Kida H., Kibe Y., Hattori N., Takeuchi J. Primary IgA glomerulonephritis and Schönlein-Henoch purpura nephritis. Clinico-pathological and immunohistological characteristics. *Quart. J. Med.* 188, 495, 1978.
- 144.— Newcomb RW., Ishizaka K. Human diphtheria antitoxin in immunoglobulin classes IgG and IgA. *J. Immunol.* 96, 197, 1965.
- 145.— Nochy D., Callard P., Bellon B., Bariety J., Druet P. Association of overt glomerulonephritis and liver disease: A study of 34 patients. *Clin. Nephrol.* 6, 422, 1976.
- 146.— Noel H., Descamps B., Jungers P. HLA antigens in three types of glomerulonephritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 10, 19, 1978.
- 147.— Nomoto Y., Sakai H. Cold-reacting antinuclear factor in sera from patients with IgA nephropathy. *J. Lab. Clin. Med.* 94, 76, 1979.
- 148.— Nomoto Y., Sakai H., Arimori S. Increase of IgA-bearing lymphocytes in peripheral blood from patients with IgA nephropathy. *Am. J. Clin. Pathol.* 71, 158, 1979.
- 149.— Normann SJ. Clearance of equine antitoxin-toxin complexes by the reticuloendothelial system. *J. Immunol.* 108, 521, 1972.
- 150.— Nussenzweig V. Interaction between complement and immune complexes: Role of complement in containing immune complex damage. pp. 1044-1056. En: *Immunology 80. Progress in Immunol. IV.* Ed por M. Fougereau y J. Dausset. Academic Press, 1980.

- 151.— Ooi YM., Vallota EH., West CD. Serum immune complexes in membranoproliferative and other glomerulonephritides. *Kidney int.* 11, 275, 1977.
- 152.— Orlans E., Peppard J., Fry JF., Hinton RH., Mullock BM. Secretory component as the receptor for polymeric IgA on rat hepatocytes. *J. exp. Med.* 150, 1.577, 1979.
- 153.— Orlans E., Peppard J., Reynolds J., Hall J. Rapid active transport of immunoglobulin from blood to bile. *J. exp. Med.* 147, 588, 1978.
- 154.— Ouchterlony O. In vitro method for testing the toxin producing capacity of diphtheria bacteria. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* 25, 186, 1948.
- 155.— Paganelli R., Levinsky RJ., Atherton DJ. Detection of specific antigen within circulating immune complexes: validation of the assay and its application to food antigen-antibody complexes formed in healthy and food-allergic subjects. *Clin. exp. Immunol.* 46, 44, 1981.
- 156.— Pardo V., Pardo T., Cherch A., Strauss J., Esquenazi V. HLA-Bw35 antigen as a marker for segmental sclerosis and progressive disease in IgA mesangial glomerulonephritis. *Kidney int.* 19, 134, 1981.
- 157.— Penner E., Albin B., Milgrom F. Detection of circulating immune complexes in alcoholic liver disease. *Clin. exp. Immunol.* 34, 28, 1978.
- 158.— Peppard J., Orlans E., Payne AWR., Andrew E. The elimination of circulating complexes containing polymeric IgA by excretion in the bile. *Immunology.* 42, 83, 1981.
- 159.— Pereira AB., Theofilopoulos AN., Dixon FJ. Detection and partial characterization of circulating immune complexes with solid-phase anti-C3. *J. Immunol.* 125, 763, 1980.
- 160.— Pestel J., Joseph M., Dessaint JP., Capron A. Macrophage triggering by aggregated immunoglobulins I. Delayed effect of IgG aggregates or immune complexes. *J. Immunol.* 126, 1.887, 1981.
- 161.— Philips-Quagliata JM. Lamm ME. Cellular and humoral aspects of the secretory IgA system. *Pendiente de publicación.*
- 162.— Plaut AG., Genco RJ., Tomasi TB Jr. Isolation of an enzyme from streptococcus sanguis which specifically cleaves IgA. *J. Immunol.* 113, 289, 1974.
- 163.— Pussell BA., Scott DM., Lockwood CM., Pinching AJ., Peters DK. Value of immune-complex assays in diagnosis and management. *Lancet* 2, 359, 1978.
- 164.— Ramos Niembro F., Lambert PH. The triggering of circulating immune complexes by polyclonal B-cell activators in mice. *Abstr.: 15.5.14.4th Int. Congr. Immunol. Paris, 1980.*
- 165.— Reif AE. Batch preparation of rabbit  $\gamma$ G globulin with DEAE-cellulose. *Immunochemistry.* 6, 723, 1969.
- 166.— Renston RH., Jones AL., Christiansen WD., Hradek GT., Underdown BJ. Evidence for a vesicular transport mechanism in hepatocytes for biliary secretion of immunoglobulin A. *Science.* 208, 1.276, 1980.
- 167.— Rifai A., Small PA., Teague PO., Ayoub E. Experimental IgA nephropathy. *J. exp. Med.* 150, 1.161, 1979.
- 168.— Robertson J., Caldwell JR., Castle JR., Waldman RH. Evidence for the presence of components of the alternative (properdin) pathway of complement activation in respiratory secretions. *J. Immunol.* 117, 900, 1976.
- 169.— Rossen RD., Reisberg MA., Singer DB., Schloeder FX., Suki WN., Hill LL., Eknayan G. Soluble immune complexes in sera of patients with nephritis. *Kidney int.* 10, 256, 1976.
- 170.— Russell MW., Brown TA., Mestecky J. Role of serum IgA. Hepatobiliary transport of circulating antigen. *J. exp. Med.* 153, 968, 1981.
- 171.— Sagawa A., Abdou NI. Suppressor-cell antibody in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 63, 536, 1979.
- 172.— Sakai H., Endoh M., Tomino Y., Nomoto Y. Helper activity of T cells in patients with IgA nephropathy. *Abstr: IM-030 p. 132, 8th Int. Congr. Nephrol. Atenas 1981.*
- 173.— Sakai H., Nomoto Y., Arimori S. Decrease of IgA-specific suppressor T cell activity in patients with IgA nephropathy. *Clin. exp. Immunol.* 38, 243, 1979.
- 174.— Sakai H., Nomoto Y., Arimori S., Komori K., Inouye H., Tsuji K. Increase of IgA-bearing peripheral blood lymphocytes in families of patients with IgA nephropathy. *Am. J. Clin. Pathol.* 72, 452, 1979.
- 175.— Sancho J. Estudio de los polimorfonucleares y de los mecanismos de depósito de la IgA en las glomerulonefritis mesangiales de IgA. *Tesina, 1979. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense. Madrid.*
- 176.— Sancho J., Egido J.A. simplified method for determining polymeric IgA-containing immune complexes. *Enviado a publicar.*
- 177.— Sancho J., Egido J., Lorente F., Fontán G., López Trascasa M., Hernando L. IgA-polymorphonuclear neutro-

- phils interactions in patients with IgA mesangial glomerulonephritis (Berger's disease). *Min. Nefr.* 27, 247, 1980.
- 178.— Schorlemmer HU., Allison AC. Effects of activated complement components on enzyme secretion by macrophages. *Immunology.* 31, 781, 1976.
  - 179.— Shvil Y., Mauer SM., Michael AF. Uptake of aggregated immunoglobulin by the mouse kidney. II. Effect of hydrocortisone. *Br. J. exp. Pathol.* 61, 30, 1980.
  - 180.— Sobel A., Gabay Y., Lagrue G. Recherche de complexes circulants par le test de desviation de la fraction C1q du complement: premieres applications a l'etude des glomerulopathies humaines. *La Nouv. Press. Med.* 5, 1.465, 1976.
  - 181.— Socken DJ., Simins ES., Nagy BR., Fisher MM., Underdown BJ. Secretory component-dependent hepatic transport of IgA antibody-antigen complexes. *J. Immunol.* 127, 316, 1981.
  - 182.— Soothill JF., Steward MW. The relationship of allergic disease to immunodeficiency. *Int. Arch. Allergy.* 45, 180, 1973.
  - 183.— Stachura I., Singh G., Whiteside TI. Immune abnormalities in IgA nephropathy. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 20, 373, 1981.
  - 184.— Stanworth DR., Turner MW. Immunochemical analysis of immunoglobulins and their subunits. Cap. 6, pp. 6.1-6.102. En: *Handbook of Experimental Immunology.* 3<sup>a</sup> edición. Ed.: Weir DM. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1978.
  - 185.— Stobo JD. Cirrhosis and hypergammaglobulinemia. *Dig. Dis. Sci.* 24, 737, 1979.
  - 186.— Stokes CR., Swarbrick ET., Soothill JF. Immune elimination and enhanced antibody responses: functions of circulating IgA. *Immunology.* 40, 455, 1980.
  - 187.— Steinberg AD., Klassen LW., Budman DR., Williams GW. Immune fluorescence studies of anti-T cell antibodies and T cells in systemic lupus erythematosus. Selective loss of brightly staining T cells in active disease. *Arthritis Rheum.* 22, 114, 1979.
  - 188.— Striker GE., Mannik M., Tung M. Role of marrow-derived monocytes and mesangial cells in removal of immune complexes from renal glomeruli. *J. exp. Med.* 149, 127, 1979.
  - 189.— Strober W., Hague NE., Lum LG., Henkart PA. IgA-Fc receptors on mouse lymphoid cells. *J. Immunol.* 121, 2.440, 1978.
  - 190.— Szabo T., Szabo M., Leukey A., Szabo J. Circulating immune complexes and phagocytic activity of polymorphonuclear cells in patients with glomerulonephritis. *Clin. Nephrol.* 12, 243, 1979.
  - 191.— Takamiya H., Batsford S., Kluhe R., Vogt A. Comparison of the handling of ferritin and ferritin-protein conjugates by the glomerular mesangium: kinetics studies in the rat. *Lab. Invest.* 40, 18, 1979.
  - 192.— Ternynck T., Avrameas S. Polyacrylamide-Protein immunoadsorbents prepared with glutaraldehyde. *FEBS Letters.* 23, 24, 1972.
  - 193.— Theofilopoulos AN., Dixon FJ. The biology and detection of immune complexes. *Adv. Immunol.* 28, 89, 1979.
  - 194.— Theofilopoulos AN., Wilson CB., Dixon FJ. The Raji cell radioimmune assay for detecting immune complexes in human sera. *J. Clin. Invest.* 57, 169, 1976.
  - 195.— Thomas HC., Potter BJ., Sherlock S. Is primary biliary cirrhosis an immune complex disease? *Lancet.* 2, 1.261, 1977.
  - 196.— Thornburg RW., Day JF., Baynes JW., Thorpe SR. Carbohydrate-mediated clearance of immune-complexes from the circulation. A role for galactose residues in the hepatic uptake of IgG-antigen complexes. *J. Biol. Chem.* 255, 6.820, 1980.
  - 197.— Tomasi TB. Jr., Bienenstock J. Secretory Immunoglobulins. *Adv. Immunol.* 9, 1, 1968.
  - 198.— Tourville DR., Bienenstock J., Tomasi TB. Natural antibodies of human serum, saliva and urine reactive with *Escherichia coli*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128, 722, 1968.
  - 199.— Trygstad CW., Stillm ER. Elevated serum IgA globulin in anaphylactoid purpura. *Pediatrics.* 47, 1.023, 1971.
  - 200.— Tsuzukida, Y., Wang CC., Putnam FW. Structure of the A2m (1) allotype of human IgA-a recombinant molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 1.104, 1979.
  - 201.— Tung KSK., Woodroffe AJ., Ahlin T. D., Williams RC. Jr., Wilson CB. Application of the solid phase C1q and Raji cell Radioimmune assays for the detection of circulating immune complexes in glomerulonephritis. *J. Clin. Invest.* 62, 61, 1978.

- 202.— Underdown BJ., De Rose J., Koczbank K., Socken D., Weicker J. Isolation of human secretory component by affinity chromatography on IgM-Sepharose. *Immunochemistry*. 14, 111, 1977.
- 203.— Underdown BJ., Dorrington KJ. Studies on the structural and conformational basis for the relative resistance of serum and secretory immunoglobulin A to proteolysis. *J. Immunol.* 112, 949, 1974.
- 204.— Valentijn RM., Kauffmann RH., Daha MR., Van Es LA. A significant correlation between the presence of IgA-complexes and the clinical activity of IgA nephropathy. Abstr. CN-133, p. 276, 8th Int. Congr. Nephrol. Atenas. 1981.
- 205.— Van Damme BJC., Fleuren GJ., Bakker WW., Vernier RL., Hoedemaeker PHJ. Experimental glomerulonephritis in the rat induced by antibodies directed against tubular antigens.V. Fixed glomerular antigens in the pathogenesis of heterologous immune complex glomerulonephritis. *Lab. Invest.* 38, 502, 1978.
- 206.— Van der Peet J., Arisz L., Brentjens JRH., Marrink J., Hoedemaeker PHJ. The clinical course of IgA nephropathy in adults. *Clin. Nephrol.* 8, 335, 1977.
- 207.— Van Epps DE., Read KJ., Williams R., Suppression of human PMN bactericidal activity by human IgA paraproteins. *Cell. Immunol.* 36, 363, 1978.
- 208.— Van Epps DE., Strickland RG., Williams RC. Jr. Inhibition of leukocyte chemotaxis in alcoholic liver disease. *Am. J. Med.* 59, 200, 1975.
- 209.— Van Epps DE., Williams RC Jr. Suppression of leukocyte chemotaxis by human IgA myeloma components. *J. exp. Med.* 144, 1.227, 1976.
- 210.— Van Marck EAE., Deelder AM., Gigase PLJ. Effect of partial vein ligation on immune glomerular deposits in *Schistosoma mansoni*-infected mice. *Br. J. exp. Path.* 58, 412, 1977.
- 211.— Van Snick JL., Masson PL. The effect of complement on the ingestion of soluble antigen-antibody complexes and IgM aggregates by mouse peritoneal macrophages. *J. exp. Med.* 148, 903, 1978.
- 212.— Walker WA., Isselbacher KJ. Intestinal antibodies. *N. Engl. J. Med.* 297, 767, 1977.
- 213.— Ward PA., Zvifler NJ. Quantitative phagocytosis by neutrophils. I. A new method with immune complexes. *J. Immunol.* 111, 1.771, 1973.
- 214.— Weiss JH., Blathena DB., Curtis JJ., Lucas BA., Luke RG. A possible relationship between Henoch-Schönlein syndrome and IgA nephropathy (Berger's disease). *Nephron.* 22, 582, 1978.
- 215.— Williams BD., Slaney IM., Price IF., Challacombe JJ. Classical pathway activation of complement system by IgA anti-C3 antibody. *Nature*, 259, 52, 1976.
- 216.— Williams RC., Gibbons RJ. Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: A mechanism of antigen disposal. *Science*. 177, 697, 1972.
- 217.— Wilson CB., Dixon FJ. Quantification of acute and chronic serum sickness in rabbit. *J. exp. Med.* 134, 7 (a), 1971.
- 218.— Wilson ID. Studies on the opsonic activity of human secretory IgA using an in vitro phagocytosis system. *J. Immunol.* 108, 726, 1972.
- 219.— Wilton JMA. Suppression by IgA of IgG-mediated phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. *Clin. exp. Immunol.* 34, 423, 1978.
- 220.— Woodroffe AJ., Gormly AA., McKenzie PE., Wootton AM., Thompson AJ., Seymour AE., Clarkson AR. Immunologic studies in IgA nephropathy. *Kidney int.* 18, 366, 1980.
- 221.— Zigmund SH., Hirsch JG. Leukocyte locomotion and chemotaxis: new methods for evaluation and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. *J. exp. Med.* 137, 387, 1973.
- 222.— Zipunsky A., Brown EJ., Bienenstock J. Lack of opsonization potential of 11 S human secretory IgA. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 142, 181, 1973.

